

**Univerzita Karlova v Praze**  
**Lékařská fakulta v Hradci Králové**  
**Ústav klinické imunologie a alergologie**



Doktorský studijní program  
**Lékařská imunologie**

**VLIV GOECKERMANOVY TERAPIE NA VYBRANÉ PARAMETRY**  
**IMUNITY U PACIENTŮ S PSORIÁZOU**

**THE EFFECT OF GOECKERMAN THERAPY ON SELECTED**  
**IMMUNE MARKERS IN PATIENTS WITH PSORIASIS**

Mgr. Kateřina Kondělková

**Školitel:**

Doc. RNDr. Ctirad Andrýs, Ph.D.

**Školitel konzultant:**

Doc. MUDr. Lenka Borská, Ph.D.

Hradec Králové, 2012

Obhajoba dne:

**Prohlášení:**

Prohlašuji tímto, že jsem doktorskou disertační práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje. Zároveň dávám souhlas k tomu, aby tato práce byla uložena v Lékařské knihovně Lékařské fakulty UK v Hradci Králové a zde užívána ke studijním účelům za předpokladu, že každý, kdo tuto práci použije pro svou publikační nebo přednáškovou činnost, se zavazuje, že bude tento zdroj informací řádně citovat.

Souhlasím se zpřístupněním elektronické verze mé práce v informačním systému Univerzity Karlovy v Praze.

**Hradec Králové, 12.6.2012**

**Poděkování:**

Chtěla bych poděkovat všem, kteří mě motivovali k uskutečnění této práce a podporovali mě ve vědecké činnosti. Nejprve bych ráda poděkovala vedoucímu disertační práce doc. RNDr. Ctiradovi Andrásovi, Ph.D. za jeho cenné rady a trpělivost při vedení mé práce. Prof. RNDr. Janu Krejskovi, CSc. za podporu, vstřícnost a pomoc při získání potřebných informací a podkladů. Rovněž bych chtěla poděkovat doc. MUDr. Lence Borské, Ph.D. za pomoc při zajištění studie. Ráda bych za spolupráci poděkovala kolegům z Kliniky nemocí kožních a pohlavních, MUDr. Květě Hamákové a doc. MUDr. Karlovi Ettlerovi, CSc. Paní Haně Kotlandové děkuji za úpravu grafických výstupů. Děkuji i kolegům z ÚKIA FN HK za morální podporu.

Velké poděkování patří mým rodičům a blízkým za jejich pochopení, povzbuzení a podporu při studiu.

Tato práce vznikla za podpory grantů MZCR č. 00179906, MŠMT č. MSM0021620812, SVV-2011-262902 a programu PRVOUK P37/09.

# Obsah

<b>Seznam použitých zkratk</b> .....	<b>6</b>
<b>1. Úvod</b> .....	<b>8</b>
1.1. Psoriáza .....	9
1.1.1. Historie psoriázy .....	9
1.1.2. Epidemiologie .....	9
1.1.3. Klinické projevy .....	11
1.1.4. Komorbidita .....	12
1.1.5. Imunopatogeneze psoriázy .....	12
1.1.6. PASI (Psoriasis Area and Severity Index) .....	15
1.1.7. Terapie psoriázy .....	15
1.1.7.1. Zevní léčba .....	17
1.1.7.2. Fototerapie .....	17
1.1.7.3. Goeckermanova terapie .....	18
1.1.7.4. Celková systémová léčba .....	21
1.1.7.5. Biologická léčba .....	22
1.2. T regulační lymfocyty (Treg) .....	22
1.2.1. Typy Treg lymfocytů .....	24
1.2.2. Funkční vlastnosti Treg lymfocytů .....	26
1.2.3. Detekce Treg lymfocytů .....	27
1.2.4. Treg lymfocyty u imunodeficiencí a imunopatologických chorob .....	27
1.3. Vychytávací receptor CD163 .....	29
1.3.1. Molekulární struktura .....	30
1.3.2. Funkce CD163 .....	31
1.3.4. Exprese CD163 .....	32
1.3.5. Solubilní forma CD163 (sCD163) .....	33
1.4. TLR receptory .....	33
1.4.1. Historie objevování TLR .....	34
1.4.2. Molekulární struktura TLR .....	34
1.4.3. Ligandy Toll-like receptorů .....	35
1.4.4. Funkce a regulace Toll-like receptorů .....	36
1.4.5. Solubilní forma TLR2 (sTLR2) .....	37
<b>2. Cíle práce</b> .....	<b>38</b>

<b>3. Metodika .....</b>	<b>39</b>
3.1. Soubor pacientů .....	39
3.1.1. Sestava pacientů s psoriázou pro analýzu T regulačních lymfocytů .....	39
3.1.2. Sestava pacientů s psoriázou pro analýzu solubilní formy vychytávacího receptoru sCD163 .....	39
3.1.3. Sestava pacientů s psoriázou pro analýzu povrchové formy vychytávacího receptoru CD163 .....	40
3.1.4. Sestava pacientů s psoriázou pro analýzu povrchové TLR2 a TLR4 a solubilní sTLR2 .....	40
3.2. Goeckermanova terapie .....	41
3.3. Odběr vzorků .....	42
3.4. Laboratorní metody .....	42
3.4.1. Průtoková cytometrie .....	42
3.4.2. ELISA technika .....	44
3.5. Statistická analýza .....	45
<b>4. Výsledky.....</b>	<b>46</b>
4.1. Stanovení relativního počtu Treg lymfocytů u pacientů s psoriázou léčených Goeckermanovou terapií.....	46
4.2. Stanovení hladin solubilní formy CD163 (sCD163) u pacientů s psoriázou léčených Goeckermanovou terapií.....	48
4.3. Stanovení exprese povrchové formy CD163 na monocytech u pacientů s psoriázou léčených Goeckermanovou terapií.....	51
4.4. Stanovení hladin solubilní formy TLR2 (sTLR2) u pacientů s psoriázou léčených Goeckermanovou terapií.....	53
4.5. Stanovení exprese povrchové formy TLR2 na monocytech u pacientů s psoriázou léčených Goeckermanovou terapií.....	56
4.6. Stanovení exprese povrchové formy TLR4 na monocytech u pacientů s psoriázou léčených Goeckermanovou terapií.....	58
<b>5. Diskuze.....</b>	<b>60</b>
<b>6. Souhrn.....</b>	<b>67</b>
<b>6. Summary.....</b>	<b>70</b>
<b>7. Závěr.....</b>	<b>73</b>
<b>8. Literatura.....</b>	<b>75</b>
<b>9. Přílohy.....</b>	<b>96</b>

## Seznam použitých zkratek

CPB	kardiopulmonární bypasem
CTLA4	cytotoxický s T lymfocyty asociovaný antigen
DAMP	damage-associated molecular patterns
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
FoxP3	forkhead box P3
GATA3	Trans-acting T-cell-specific transcription factor
GITR	glukokortikoidy indukovaný receptor pro tumor nekrotizující faktor
GT	Goeckermanova terapie
Hb	hemoglobin
HO	hemoxxygenáza
Hp	haptoglobin
HSP	protein tepelného šoku
ICAM-1	intracelulární adhezní molekula 1
IL	interleukin
INF	interferon
IRAK2	interleukin-1 receptor-associated kinase-like 2
LAG-3	lymphocyte-activation gene 3
LPS	lipopolysacharid
MFI	mean fluorescence index
MHC	hlavní histokompatibilní komplex
MyD88	myeloid differentiation primary response gene (88)
MyD88s	myeloid differentiation 88 short
NFκB	nukleární faktor kappa B
NGF	nerve growth factor
PAMP	molekulové vzory asociované s patogenem
PASI	psoriasis area and severity index
PAU	polycyklické aromatické uhlovodíky
PDC	plazmocytoidní dendritické buňky
PMA	phorbol 12-myristate 13-acetate
PRR	pattern recognition receptor
RORγt	retinoid-related orphan receptor γt

SRCR	scavenger receptor cystein-rich
sCD163	solubilní CD163
STAT3	signal transducer and activator of transcription 3
sTLR2	solubilní TLR2
T-bet	T cell specific T-box transcription factor
TCR	receptor pro antigen na T lymfocytech
TGF	transformující růstový faktor
TIRAP/Mal	Toll-interleukin 1 receptor (TIR) domain containing adaptor protein / MyD88 adaptor-like
TLR	Toll-like receptor
TNF	tumor nekrotizující faktor
Treg	T regulační lymfocyty
TRIF	TIR-domain -containing adapter-inducing interferon- $\beta$
VEGF	vaskulární endotelový růstový faktor

# 1. Úvod

Kožní imunitní systém je tvořen řadou buněčných typů a humorálních faktorů. Deregulace kožního imunitního systému může vést k zánětu v kůži. Psoriáza je typickým příkladem takto škodlivé zánětlivé reakce. Je to chronická, opakující se zánětlivá kožní choroba se stále do značné míry neznámou etiologií. Ke vzniku této choroby vede spolupráce mezi složkami vrozeného a získaného imunitního systému. Psoriáza je choroba se značným nepříznivým dopadem na zdraví pacienta a narušuje psychický, psychologický a sociální život (120). Pacienti často tvrdí, že zánětlivé kožní choroby, zejména psoriáza, bývají iniciovány nebo zhoršeny stresujícími událostmi v životě (41, 58). V léčbě psoriázy se uplatňuje kromě řady dalších postupů i Goeckermanova metoda terapie (GT), která je založená na denní aplikaci farmaceutického uhelného dehtu na zasaženou pokožku s následnou expozicí těla kontrolovanému množství UV záření. Tato terapie je vysoce účinná v léčbě psoriázy a dosahuje dobré klinické odpovědi následované dlouhodobou remisí u většiny pacientů.

Deficitní T regulační lymfocyty (Treg) byly nalezeny v řadě autoimunitních stavů, včetně psoriázy. Nedávno byla u pacientů s psoriázou prokázána nerovnováha mezi Treg a efektovými T lymfocyty. Proto je pravděpodobné, že počet a/nebo funkce Treg může být u pacientů s psoriázou narušena, což může vést ke zvýšené proliferaci patogenních T lymfocytů. Předpokládá se, že defektní Treg lymfocyty jsou zapojené do patogeneze psoriázy (71, 140, 161, 169).

Monocyty a makrofágy jsou velmi důležité buňky vrozeného imunitního systému a jejich vědecké zkoumání je nezbytně nutné k porozumění zánětlivé podstaty psoriázy (43). Receptor CD163 je molekula nacházející se výhradně na monocitech/makrofázích. Protože informace týkající se vlivu Goeckermanovy terapie (GT) na expresi CD163 jsou velmi řídké, sledovali jsme modulaci jak membránové, tak solubilní formy sCD163 u pacientů s psoriázou.

Receptory Toll-like (TLR) jsou důležitou součástí přirozené imunity a jejich abnormální exprese může být zapojena do řady zánětlivých chorob, včetně psoriázy. Proto jsme se v naší práci zaměřili na sledování změn exprese jak membránové formy TLR2 a TLR4, tak solubilní formy sTLR2 u pacientů s psoriázou během Goeckermanovy terapie a naměřené výsledky jsme porovnávali s kontrolní skupinou.



## **1.1. Psoriáza**

Psoriáza je definována jako T lymfocyty zprostředkovaná imunitní systémová zánětlivá choroba s manifestací na pokožce. Toto onemocnění je charakterizováno hyperproliferací a abnormální diferenciací keratinocytů, zánětlivými změnami na cévách, infiltráty z aktivovaných T lymfocytů, hromaděním polymorfonukleárů, hojnou proliferací endotelových buněk a deregulací apoptózy (13). Epidermální hyperproliferace je úzce spjata s hojnou angiogenezí (1). Do patofyziologie psoriázy přispívá jak přirozený tak adaptivní imunitní systém (48)

### **1.1.1. Historie psoriázy**

Z historie lékařství zjišťujeme, že lupénka byla pozorována již před 4 tisíci lety. Vědci objevili typické psoriatické plaky na mumifikovaných tělech z počátku křesťanské éry. Řecký lékař Hippokrates (460 - 377 př. n. l.) byl prvním, který se o tomto onemocnění zmínil. Na počátku 19. století popsal lupénku jako samostatné kožní onemocnění anglický lékař Robert Willan (1757 - 1812). Pojmenoval ji „Willanova lepra“. V roce 1842 vídeňský dermatolog, Ferdinand von Hebra, který pracoval na Willanových spisech, použil k označení této choroby slovo psoriáza. Označení choroby pochází z řeckého slova psóra a znamená „svrbění“ nebo také „šupina“ (32).

### **1.1.2. Epidemiologie**

Psoriáza je chronická neinfekční zánětlivá kožní choroba, která postihuje přibližně 1 - 3% populace a má výrazný vliv na fyzické, psychické i sociální aspekty kvality života jedince (10, 29, 120). Nejrozšířenější je u bělochů v Evropě a severní Americe. Méně často postihuje rasu žlutou, u černochů se s ní setkáváme výjimečně a u Eskymáků nebo jihoamerických indiánů psoriáza nebyla popsána (2). Je stejně častá jak u mužů tak u žen (58).

Na základě epidemiologických a genetických faktorů rozeznáváme 2 klinické formy psoriázy. Typ I představuje přibližně 75% pacientů, u nichž se psoriáza manifestuje poprvé do 40 let věku. Typická je pozitivní rodinná anamnéza a spojení s antigeny hlavního histokompatibilního komplexu (MHC), nejsilněji s HLA Cw6. Průběh bývá těžší rozsahem i

intenzitou. Psoriáza propuká u dětí rodičů, kteří netrpěli touto chorobou, asi ve 12 % případů. Pokud jeden z rodičů trpí psoriázou, zvyšuje se toto procentuální zastoupení na 10-20 %. Pokud psoriázou trpí oba rodiče i jejich dítě, má další dítě 50% pravděpodobnost, že se u něho rozvine psoriasis vulgaris. Pokud touto kožní chorobou trpí pouze sourozenec, ale rodiče nikoli, tak riziko klesá na 8%. Typ II se poprvé manifestuje po 40. roce věku, obvykle mezi 50. a 60. rokem. Tento typ je charakterizován negativní rodinnou anamnézou a zároveň chybí asociace s typickými antigeny MHC. Průběh bývá lehčí, ale častěji se objevuje artropatická forma (2, 10).

Bylo identifikováno nejméně 10 chromozomálních lokusů, u kterých bylo prokázáno statisticky významné spojení s psoriázou (označení PSORS1-10) (58). Jak bylo uvedeno výše, existuje silná vazba psoriázy I. typu s MHC. Jedná se zejména o antigeny HLA Cw6, HLA B13, HLA B27, HLA A2, a HLA Bw57. Antigen HLA Cw6 (v oblasti PSORS1) je spojen s psoriázou u všech etnik, 55–80 % bělochů s psoriázou vykazuje asociaci s tímto antigenem. U HLA Cw6 pozitivních pacientů se setkáváme nejčastěji s kapkovitým typem psoriázy, s Koebnerovým fenoménem a v těhotenství u nich běžně dochází k remisi. (35, 77, 101, 102, 150).

Četné faktory přispívají k iniciaci psoriázy. Zahrnují specifické genetické faktory, jako jsou alely hlavního histokompatibilního komplexu, a různé spouštěcí faktory (13, 140, 161). Provokující faktory mohou být zevní – fyzikální (tření, tlak, trauma - Koebnerův fenomén, operace) a chemické (iritace kůže detergenty). Jsou známy dermatózy, které mohou vést k propuknutí psoriázy (alergická kontaktní dermatitida na rukou a nohou). Vnitřní spouštěcí faktory mohou zahrnovat infekční nemoci (tonzilitida, faryngitida, osteomyelitida, infekce HIV), metabolické vady (obezita, hyperlipidémie, hypokalcémie), vnitřně podávané léky (antagonista  $\beta$ -receptorů, soli lithia, chlorochin, interferony, inhibitory ACE) a stres (17, 152). Řada pacientů s psoriázou uvádí, že jejich choroba se zhoršila stresem. Fortune a spol. ve své studii prokázali, že psychická úzkost významně snižuje účinnost léčby psoriatických lézí u pacientů, kteří podstoupili PUVA terapii (41). U psoriázy je typický tzv. Koebnerův fenomén, vznik nových ložisek vlivem fyzikálního, mechanického nebo chemického podráždění (2, 58).

### 1.1.3. Klinické projevy

Podle druhu lézí dělíme psoriázu na podskupiny: psoriasis vulgaris (ložisková psoriáza), psoriasis guttata, psoriasis nummularis, psoriasis geographica, psoriasis pustulosa, psoriasis follicularis, psoriasis erythrodermica a psoriatická artritida.

Psoriasis vulgaris je nejčastější forma psoriázy. Představuje přibližně 80% případů. Tento typ je charakterizován výskytem ostře ohraničených polokulovitých vyvýšených růžových až červených ložisek na kůži, které jsou na povrchu kryty bílými nebo stříbřitými drolicími se šupinami. Ačkoli se psoriáza může vyskytnout na jakémkoli místě na těle, nejčastějšími místy kožních projevů jsou lokty, kolena, bederní oblast a bérce. Často bývá postižena vlasatá část hlavy a nehty. U většiny pacientů je přítomnost plaků provázená svěděním. Psoriasis vulgaris má dvě stádia: časné (tzv. akutně exantematické) a vleklé (tzv. chronicky stacionární). Časné stádium se vyskytuje spíše u mladších pacientů, často po akutní infekci (angína, chřipka, spalničky). Postihuje kůži na trupu a končetinách. Typická jsou drobná ložiska typu psoriasis guttata s hustým výsevem bez infiltrace. Často samovolně odeznívá během několika týdnů. Vleklé stádium může vzniknout přímo nebo se vyvíjí z akutní formy. Vyskytuje se spíše ve středním věku, častěji po působení zevních provokačních faktorů. Kožní projevy jsou na typických místech na těle - na loktech, kolenou, v bederní oblasti, na bérkách, ve kšticí. Psoriatická ložiska nevykazují sklon ke spontánní remisi. Tato forma psoriázy vyžaduje intenzivní terapii (2, 58).

Pro psoriasis guttata jsou typické malé červené šupinaté skvrnky ve tvaru kapky. Začátek onemocnění je často spjat se streptokokovou infekcí horních cest dýchacích. Má sklon spontánně vymizet po několika týdnech a může se opět objevit ve stejné podobě nebo jako klasická ložisková psoriáza (32, 58).

Psoriasis nummularis se projevuje kulatými lézemi o průměru až několika centimetrů. Tvarem a velikostí se podobají minci. Numulární psoriatická ložiska se mohou dalším rozšiřováním měnit v rozsáhlé mapovité oblasti s větší tvorbou šupin (psoriasis geographica) (2).

Psoriasis pustulosa postihuje méně než 10% pacientů a může se objevit jako komplikace ložiskové psoriázy při užívání nebo vysazení určitých léků. Charakteristické jsou puchýřky naplněné hnisem, bez přítomnosti infekce (32, 58).

U psoriasis follicularis jsou kožní změny vázány nejprve na folikuly v podobě menších erytematoskvamózních nebo papulózniích změn. Tento typ se vyskytuje zejména u dětí a může vzniknout po proběhlé streptokokové infekci (2).

Psoriasis erythrodermica je těžká, vzácná forma. Postihuje většinu plochy těla a kůže se stává erythemato-skvamózní (pokrývají ji červené, odlupující se plochy) a jsou přítomny celkové příznaky (horečka, bolesti kloubů apod.). (32, 58).

Psoriáza nehtů (psoriasis unguium) doprovází kožní symptomy, ale může být i jediným projevem onemocnění. Vyznačuje se dolíčkováním nehtů, žlutavě prosvítajícími skvrnami nehtů (olejové skvrny) či podnehtovou hyperkeratózou (34, 58, 101).

Po několika letech od vypuknutí psoriázy se u 6-42 % nemocných může vyskytnout artropatická forma psoriázy. Výjimečně se tato psoriatická artritida může objevit před propuknutím a nebo v nepřítomnosti kožních projevů. Jedná se o zánětlivou chronickou artritidu s různým stupněm postižení kloubů. Začátek onemocnění je většinou pozvolný, nejčastěji postihuje jeden malý kloub horních nebo dolních končetin. Postižení jednoho kloubu se v průběhu let může rozšířit na onemocnění více kloubů. 40% pacientů trpí postižením pěti a více kloubů, u 20% pacientů dojde k progresivním kostním změnám, podobným těm u revmatoidní artritidy. Přibližně 5% pacientů je postiženo agresivní formou, která vede k rychlé destrukci kloubů. Velmi důležitá je včasná diagnóza. Léčba psoriatické artritidy pomocí biologické terapie anti TNF- $\alpha$  je velmi efektivní a brání v rozvoji kostních změn (58, 101).

#### **1.1.4. Komorbidita**

U pacientů s psoriázou se častěji setkáváme s vyšším výskytem aterosklerózy, infarktu myokardu, ischemické choroby dolních končetin a centrálních mozkových příhod než u zdravé populace. Choroby spojené s psoriázou se týkají pohybového aparátu, kardiovaskulárního systému, gastrointestinálního traktu a centrální nervové soustavy. Současně se vyskytují imunologicky podmíněné choroby, jako jsou Crohnova choroba a ulcerózní kolitida, psoriatická artritida, Bechtěrevova choroba a patrně i roztroušená skleróza. Dále se současně s psoriázou setkáváme s chorobami jako jsou diabetes mellitus II. typu, dyslipidémie, arteriální hypertenze, hyperkoagulace, dna a další (10, 11, 49, 101).

#### **1.1.5. Imunopatogeneze psoriázy**

Imunopatogeneze psoriázy je komplexní a zahrnuje jak vrozený imunitní systém (keratinocyty, dendritické buňky, histiocyty, žírné buňky, endoteliální buňky, NK buňky,

makrofágy a další) tak specifický imunitní systém (T lymfocyty) (167, 27). Nejprve dochází k aktivaci buněk vrozené imunity (dendritických buněk a keratinocytů). Tyto aktivované buňky produkují řadu chemokinů, cytokinů a růstových faktorů. Aktivované dendritické buňky (Langerhansovy buňky, dermální dendritické buňky a plazmocytoidní dendritické buňky - PDC) zpracovávají antigen (endogenní či exogenní) a cestují do příslušných lymfatických uzlin, kde prezentují tento antigen T lymfocytům. Prezentovat antigen mohou i aktivované keratinocyty. Předpokládá se přítomnost antigenu či autoantigenu, který vede k aktivaci T lymfocytů. Povaha tohoto antigenu není doposud jistá. Zvažují se antigeny *Streptococcus pyogenes* a z endogenních antigenů molekuly keratinu (5, 16, 131). Možný je i vliv nespecifické aktivace T lymfocytů superantigeny (149). Následně dochází k aktivaci a diferenciaci T lymfocytů s expanzí příslušných T buněčných klonů. Tyto T lymfocyty se poté dostávají za pomoci adhezních molekul na místa zánětu v kůži a spouštějí hyperproliferaci v epidermis (29, 101, 130). V psoriatické pokožce dochází k vysoké expresi některých adhezních molekul: intracelulární adhezní molekula-1 (ICAM-1) na epidermálních keratinocytech a E-selektin na dermálních kapilárách (58, 90). Tímto způsobem dochází k aktivaci T lymfocytů v iniciační fázi psoriázy. Během chronické fáze psoriázy probíhá aktivace T lymfocytů přímo v kůži. Prezentace antigenu (endogenního či exogenního) probíhá v tomto případě v psoriatických lézích.

V rozvoji psoriatických ložisek hrají významnou roli i dendritické buňky (Langerhansovy buňky, dermální dendritické buňky a plazmocytoidní dendritické buňky - PDC). PDC jsou málo početnou buněčnou populací v periferní krvi a sekundárních lymfatických orgánech a podílí se na protivirové obraně díky své unikátní schopnosti uvolňovat velké množství IFN- $\alpha$  (35, 103). PDC prostřednictvím IFN- $\alpha$  aktivují některé složky přirozené imunity a podporují zánět u psoriázy (35, 103). PDC exprimují výhradně TLR7 a TLR9 (86). Za normálních okolností PDC nerozpoznávají a nereagují na vlastní DNA. Naopak je tomu u autoimunitních onemocnění. Klíčový mediátor aktivace PDC u psoriázy je LL37, endogenní antimikrobiální peptid, který je typickým příkladem endogenního signálu nebezpečí charakteru alarminu. LL37 je produkován psoriatickými keratinocyty a je přítomen v psoriatických ložiscích. LL37 se u pacientů s psoriázou váže s vlastní DNA a tyto komplexy pak aktivují PDC připojením na jejich Toll-like receptory TLR7 a TLR9, což vede k uvolnění IFN- $\alpha$  k dalšímu rozvoji psoriatického zánětu (35, 103).

Zánětlivý infiltrát psoriatických plaků je tvořen T lymfocyty, NK a NKT buňkami, monocyty, makrofágy, polymorfonukleárními leukocyty (zejména neutrofily) a žírnými buňkami. Nejpočetnější populací infiltrátu jsou T lymfocyty. Největší část všech

infiltrovaných T lymfocytů v psoriatickém plaku tvoří CD45RO+ paměťové efektorové buňky. Naproti tomu, CD45RA+ naivní buňky nacházíme zejména v lymfatických uzlinách. Navíc, většina T lymfocytů má na svém povrchu větší množství aktivačních markerů, jako jsou CD25, HLA-DR a CD69. V psoriatických ložiscích je typická Th1 odpověď s tvorbou charakteristických cytokinů IL-2, TNF- $\alpha$  a IFN- $\gamma$  (22, 35, 34, 58, 107, 152). Pomocné Th1 lymfocyty (CD4+) se nachází zejména v dermis, zatímco v epidermis převažují cytotoxické (CD8+) T lymfocyty. CD8+ T lymfocyty jsou převážně spojovány s chronickými přetrvávajícími psoriatickými plakami, zatímco CD4+ T lymfocyty jsou pravděpodobně zapojené do iniciační fáze psoriázy (4). Kromě těchto subpopulací jsou v kožních lézích přítomny také Th17 a T regulační lymfocyty (Treg). Diferenciace na lymfocyty Th17 je indukována po stimulaci antigenem kombinací cytokinů TGF- $\beta$  a IL-6. Kromě role v diferenciaci Th17 je TGF- $\beta$  nezbytný také pro vznik protizánětlivých T regulačních buněk. Působení TGF- $\beta$  na vývoj T lymfocytů je závislé na koncentraci. V nízkých koncentracích a spolu s prozánětlivými cytokiny (IL-6, IL-21) indukuje expresi IL-23R a v přítomnosti IL-23 vede ke vzniku Th17. Ve vysokých koncentracích naopak expresi IL-23R potlačuje a naopak podporuje expresi FoxP3 a diferenciaci na Treg lymfocyty (45, 92). Th17 lymfocyty produkují prozánětlivé cytokiny IL-17A, IL-17F, IL-22 a IL-26, čímž aktivují keratinocyty, které proliferují a následně také tvoří prozánětlivé cytokiny (35). Treg lymfocyty mají schopnost potlačovat aktivaci a proliferaci CD4+ a CD8+ efektorových T-lymfocytů, a to buď přímým kontaktem nebo prostřednictvím cytokinů (35, 75, 148).

Aktivaci keratinocytů způsobují cytokiny produkované Th1 lymfocyty (zejména INF- $\gamma$  a IL-22) a Th17 lymfocyty (IL-17A, IL-17F, IL-22 a IL-26). Aktivované keratinocyty u psoriázy jsou schopné produkovat řadu prozánětlivých cytokinů, chemokinů a růstových faktorů. Jsou rezistentní k apoptóze, mají zvýšenou proliferaci a typické pro ně jsou poruchy maturace (22). Keratinocyty v postižené i nepostižené psoriatické kůži exprimují vysoké hladiny NGF (nerve growth factor), který působí jako mitogen keratinocytů a zabraňuje jejich apoptóze (114). INF- $\gamma$  může také inhibovat apoptózu keratinocytů, což přispívá k jejich hyperproliferaci.

Cévy psoriatických plaků jsou prodloužené, rozšířené a klikaté. Krevní průtok v pokožce s plakami je výrazně vyšší v porovnání s klinicky nezasaženou kůží u téhož pacienta. K těmto cévním změnám dochází brzo během tvorby psoriatického plaku, dříve než je možné klinicky nebo histologicky detekovat zjevnou epidermální hyperplazii. T lymfocyty aktivované keratinocyty produkují řadu cytokinů s angiogenním potenciálem, zejména VEGF

(vaskulární endotelový růstový faktor) (14). Angiogeneze může hrát významnou roli v patogenezi psoriázy (22).

U psoriázy byla zjištěná zvýšená jak kožní tak systémová exprese různých prozánětlivých cytokinů, např. interleukinů (IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, IL-15, IL-17, IL-18, IL-19, IL-20, IL-22, IL-23) a IFN- $\gamma$  (113).

#### **1.1.6. PASI (Psoriasis Area and Severity Index)**

Existují tři stupně závažnosti psoriázy: mírná, střední a závažná. Závažnost onemocnění se hodnotí pomocí objektivního systému hodnocení, tzv. PASI skóre (Psoriasis Area and Severity Index). PASI skóre je matematické vyjádření aktivity onemocnění. Psoriatické léze jsou hodnoceny podle 3 kritérií: 1. červenání (R), 2. tloušťka (T), 3. šupiny (S). Ohodnocení závažnosti pro každé kritérium je od 0 do 4. Tělo je rozděleno do 4 oblastí: hlava (h), horní končetiny (r), trup (t) a dolní končetiny (n). U každé oblasti je škála postiženého povrchu obodována od 0 do 6 (A). Aktivita onemocnění se počítá podle vzorce:

$$\text{PASI} = 0,1 * (R_h + T_h + S_h) * A_h + 0,2 * (R_r + T_r + S_r) * A_r + 0,3 * (R_t + T_t + S_t) * A_t + 0,4 * (R_n + T_n + S_n) * A_n.$$

PASI využívá bodového hodnocení od 0 - 72 (101).

#### **1.1.7. Terapie psoriázy**

Psoriáza je stále nevyléčitelná nemoc. V minulosti byla léčba pouze symptomatická. Terapie psoriázy je komplexní. Zahrnuje nejen přístup medicínský, ale i psychologický a sociální. V léčbě se klade důraz také na prevenci. Každému pacientovi se stanovuje individuálně dle věku, klinické odpovědi na předchozí léčbu, subjektivních obtíží, ovlivnění kvality života, dostupnosti, ekonomických možností a především compliance pacienta. Pro léčbu psoriázy je dostupná terapie zevní, fototerapie, Goeckermanova terapie, celková systémová a biologická léčba. Často se terapie kombinuje, čímž se zvyšuje účinnost a snižuje se možnost nežádoucích účinků (10) (Tab č.1).

Typ léčby	Lék/ UV záření	Působení
Zevní léčba	Emolienca	hydratační, deskvamační, regenerace, regulace pH kůže a obnova kožní bariéry
	Kortikoidy (alklometazon, betametazon valerát, methylprednisolon aceponát, betametazon dipropionát, mometazon furoát, fluocinolon acetonid, flutikason dipropionát, halcinonid a clobetasol propionát.	protizánětlivé, imunosupresivní a antimitotické, ovlivnění růstu, diferenciací a funkce monocytů a lymfocytů, potlačení produkce cytokinů
	Analoga vit. D3 (kalcipotriol, kalcitriol a takalcitol)	snížení epidermální proliferace a diferenciací keratinocytů
Fototerapie	UVB (311 nm)	antiproliferativní a imunomodulační, indukce apoptózy hyperproliferativních keratinocytů a snížení počtu T lymfocytů v lézích
Goeckermanova terapie	5% farmaceutický uhelný dehet a UV záření	protizánětlivé a imunomodulační efekty alifatických a aromatických uhlovodíků v dehtu a imunosupresivní a imunomodulační působení UV záření
Celková systémová léčba	Acitretin	snížení epidermální hyperproliferace a následná podpora normální diferenciací keratinocytů
	Cyklosporin A	narušení signální transdukce T lymfocytů a následná snížená produkce cytokinů
	Metotrexát	potlačení proliferace keratinocytů a ovlivnění infiltrace imunocytů do kůže
Biologická léčba	Etanercept, infliximab, adalimumab	antagonisté TNF- $\alpha$
	efalizumab a alefacept	inhibitory aktivace a migrace T lymfocytů
	ustekinumab	blokátoři p40

**Tabulka č. 1** Léčba psoriázy



#### **1.1.7.1. Zevní léčba**

Emoliencia slouží jako podpůrná terapie k promazávání či koupelím. Mají hydratační, deskvamační účinky, napomáhají regeneraci, regulují pH kůže a obnovují kožní bariéru.

Lokální kortikoidy jsou dosud hlavní volbou léčby psoriázy, zejména v počátečních, zánětlivých fázích. Dle síly je dělíme do tříd I až IV. Nejvíce se v léčbě psoriázy používají silnější kortikoidy. Ze středně silných jsou u nás k dispozici alklometazon, betametazon valerát a methylprednisolon aceponát. Ze silných pak betametazon dipropionát, mometazon furoát, fluocinolon acetonid, flutikason dipropionát, halcinonid a velmi silný clobetasol propionát. Tyto léky působí protizánětlivě, imunosupresivně a antimitoticky. Ovlivňují růst, diferenciaci a funkci monocytů a lymfocytů. Potlačují produkci cytokinů. Výsledkem těchto dějů může být pokles T lymfocytární aktivity. Dále bylo zjištěno, že díky kortikoidům dochází k obnovení normálního CD4/CD8 poměru v subepidermálních infiltrátech. Během léčby kortikoidy se mohou vyskytnout některé vedlejší účinky, jako například atrofie kůže, dilatace cév, strie, telangiektázie, purpura, hypertrichóza, akneiformní erupce a hypopigmentace (10, 22, 101).

Lokální analoga D3 vitamínu jsou v současnosti první volbou v terapii mírné až střední psoriázy. Používají se tři preparáty: kalcipotriol, kalcitriol a takalcitol. Léčba psoriatických plaků těmito přípravky vyvolává snížení epidermální proliferace a diferenciaci keratinocytů. Působí také na různé typy buněk v kůži, včetně buněk zánětu (monocyty a T lymfocyty). Analoga D3 vitamínu jsou ve většině případů dobře tolerovaná a mají dobrý klinický efekt. Nezpůsobují závažné vedlejší účinky jako kortikoidy, ale mohou vyvolat podráždění, zejména pokud se jedná o aplikaci v oblasti obličeje (10, 22, 101).

K dlouhodobé udržovací léčbě jsou také používány retinoidy (tazaroten), pro stacionární či hospitalizační léčbu cignolin, pix a ichthamol (10, 22).

#### **1.1.7.2. Fototerapie**

Moderní fototerapie se rozvíjí od 70. let. U psoriázy se využívá zejména účinků antiproliferativních a imunomodulačních. Fototerapie indukuje poškození DNA a apoptózu hyperproliferativních keratinocytů a snižuje počty T lymfocytů v psoriatických lézích. Na psoriázu je nejúčinnější úzké spektrum UVB o vlnové délce 311 nm. Mezi kontraindikace této léčby patří fotosenzitivita, kožní prekancerózy a neoplazie, stav po chemoterapii, nereagující

či zhoršující se stav při přirozeném slunění či předchozí fototerapii, nespolupracující pacient, těžké duševní, kardiovaskulární a metabolické choroby, epilepsie, ztížená mobilita, apod. Ozařování déle než tři měsíce nemá smysl, neboť dochází k hyperplazii epidermis a pigmentaci, které zabraňují průniku UV záření do epidermis. Tato léčba je plně hrazená pojišťovnami, je účinná a relativně bezpečná s delšími remisemi než u lokální terapie, ale vyžaduje pravidelné docházení. Na některých pracovištích doplňují fototerapii o kombinace s balneoterapií - balneofototerapie. Již samotná vanová koupel bez přísad zvyšuje účinky UV záření. Používají se koupele solné, olejové, bylinné, apod. (10, 22, 101).

### **1.1.7.3. Goeckermanova terapie**

V léčbě psoriázy se uplatňuje kromě řady dalších postupů i Goeckermanova metoda terapie (GT), která je založená na denní aplikaci farmaceutického uhelného dehtu na zasaženou pokožku s následnou expozicí těla kontrolovanému množství UV záření. Tato terapie byla představena doktorem Williamem Goeckermanem, který využil fotosenzibilizačního potenciálu kamenouhelného dehtu v roce 1925. V té době patřil k týmu lékařů na Mayo Clinic (Rochester, Minnesota, USA), kde je tato terapie využívána dodnes (51, 81). V České republice patří Goeckermanova terapie psoriázy stále mezi často používané léčebné postupy. Navzdory potenciálnímu zvýšenému genotoxickému riziku v důsledku přímého vystavení pokožky uhlovodíkům nacházejících se v uhlém dehtu, je tato terapie preferována z několika důvodů. Mezi nimi jsou nejdůležitější snadná aplikace, nízká cena a dosažení dobrých klinických výsledků s dlouhodobou remisí (51, 89).

Nemocnému je večer aplikována dehtová mast obsahující 5 % farmaceutický dehet (pix lithantracis) na zasaženou pokožku. Mast působí přes noc a ráno je odstraněna pomocí olejové lázně. Následně je pacient ozářen kontrolovaným množstvím UV záření. Zbytky dehtové masti jsou odstraněny koupelí (Obr. č. 1 - 3).

Goeckermanova terapie, která je založena na kombinaci protizánětlivých a imunomodulačních efektů alifatických a aromatických uhlovodíků a imunosupresivních a imunomodulačních aktivitách UV záření, je vysoce účinná v léčbě psoriázy. GT dosahuje dobré klinické odpovědi následované dlouhodobou remisí u většiny pacientů. Pomocí GT dochází ke snížení abnormální hyperproliferativní kapacity epidermálních buněk. Účinky UV záření jsou antiproliferativní a imunointervenční, mezi něž patří zvýšení produkce

protizánětlivých a imunosupresivních mediátorů, modulace exprese adhezních molekul a buněčných receptorů a indukce apoptózy.

Z hlediska terapie kožních onemocnění je nejvýznamnější kamenouhelný dehet (pix lithanthracis). Ten se získává suchou destilací kamenného uhlí. Tento dehet je viskózní lesklá hnědočerná až černá tekutina s charakteristickým zápachem po naftalenu. Ve vodě je téměř nerozpustný (31). Obsahuje asi 10 000 chemických sloučenin (31, 147). Jedná se o směs aromatických a alifatických uhlovodíků a jejich derivátů. Složení farmaceutického dehtu se mění v závislosti na použitém uhlí a teplotě vzniku (147). Přesný mechanismus působení kamenouhelného dehtu není znám. Tento dehet má protizánětlivé a antibakteriální účinky, snižuje svědění a má také fotosenzibilizační efekt (123).



**Obrázek č. 1** *Pacient s psoriázou před zahájením Goeckermanovy terapie*



**Obrázek č. 2** *Pacient s psoriázou potřený 5% farmaceutickým dehtem během Goeckermanovy terapie*



**Obrázek č. 3** *Pacient s psoriázou po Goeckermanově terapii*

Negativní vedlejší účinky při použití dehtu zahrnují tmavé zabarvení kůže, nepříjemný zápach a možnosti znečištění oděvu. Po aplikaci dehtových léčebných preparátů se může objevit folikulitida, alergická či iritační kontaktní dermatitida, atrofie, teleangiektazie, pigmentace a fototoxické či fotosenzibilizační reakce (31, 123).

#### **1.1.7.4. Celková systémová léčba**

Tato terapie je vyhrazena pro těžké případy, nereagující na lokální léčbu a fototerapii. Vzhledem k nežádoucím účinkům a s ohledem na chronicitu psoriázy je potřeba individuálně zvážit poměr rizik ku prospěchu. Pro celkovou systémovou léčbu jsou v ČR k dispozici tři léky: acitretin, cyklosporin A a metotrexát.

Acitretin patří mezi generaci aromatických retinoidů. Velmi dobrý účinek má u pustulózního typu psoriázy a psoriasis erythrodermica. U diseminované ložiskové psoriázy má efekt v kombinaci s fototerapií. Acitretin snižuje epidermální hyperproliferaci a následně podporuje normální diferenciaci keratinocytů.

Cyklosporin A patří mezi imunosupresiva. Používá se u těžkých forem psoriázy. Během léčby je nutné monitorovat především krevní tlak a ledvinové funkce. Je to vynikající lék pro rychlé navození remise, není vhodný pro dlouhodobou udržovací léčbu. Cyklosporin A interaguje s cyklofilinem, proteinem běžným v každé lidské buňce. Komplex cyklosporinu A a cyklofilinu inhibuje aktivitu fosfatázy kalcineurinu, který je důležitý pro řadu intracelulárních signálních cest. Utlumený kalcineurin narušuje signální transdukcii T lymfocytů, což vede ke snížené produkci cytokinů.

Metotrexát je indikován u těžké ložiskové psoriázy a nejčastěji se používá při současném postižení kůže i kloubů. Je nezbytné pravidelné laboratorní monitorování jaterních testů a krevního obrazu. Dlouhodobým rizikem je jaterní cirhóza. Tento lék potlačuje proliferaci keratinocytů a také ovlivňuje infiltraci imunocytů do kůže.

V Evropské unii, respektive v Německu a Holandsku, se používají pro celkovou systémovou léčbu estery kyseliny fumarové, fumaráty. Indikací je těžká psoriáza všech forem. Při použití těchto léků je potřeba monitorovat jaterní a ledvinové testy a krevní obraz. Fumaráty vyvolávají apoptózu aktivovaných CD4<sup>+</sup> a CD8<sup>+</sup> T lymfocytů v kůži a periferní krvi, mají efekt na keratinocyty, dendritické buňky, endotelové buňky a chemo- a cytokiny (10, 22, 101).

### 1.1.7.5. Biologická léčba

Biologika jsou monoklonální protilátky, fúzní proteiny s imunoglobuliny nebo rekombinantní cytokiny. Do patogeneze psoriázy zasahují na úrovni T lymfocytů, antigen prezentujících buněk, kostimulačních a adhezních molekul nebo cytokinů. Podávají se parenterálně a vzhledem k heterogenitě psoriázy nenastává klinický efekt u všech pacientů. V některých případech vede podávání těchto léků k aktivaci latentní tuberkulózy, vzniku lymfoproliferativních chorob, hepatopatii a/nebo tvorbě autoprotilátek.

Biologika působí třemi způsoby a na základě těchto vlastností je můžeme rozdělit na antagonisty TNF- $\alpha$ , inhibitory aktivace a migrace T lymfocytů a blokátory p40. Mezi antagonisty TNF- $\alpha$  patří etanercept (humánní fúzní protein Fc fragmentu IgG1 a TNF- $\alpha$  receptoru), infliximab (chimérická monoklonální protilátka proti TNF- $\alpha$ ) a adalimumab (rekombinantní plně humánní monoklonální protilátka proti TNF- $\alpha$ ). Proti T lymfocytům jsou zaměřené léky efalizumab (anti-CD11a) a alefacept (CD2 inhibitor) (není registrován v EU) (10, 22, 35, 70, 101, 137). Do skupiny blokátorů p40 patří ustekinumab (humánní monoklonální protilátka, která se s vysokou afinitou a specificitou váže na proteinovou podjednotku p40 interleukinu IL-12 a IL-23). Další preparáty ze skupiny blokátorů p40 jsou ve fázi klinických zkoušek.

S rozvojem molekulární biologie se nabízejí stále větší možnosti využití biologické léčby. Léčba biologiky je spojena s výrazným klinickým zlepšením u řady pacientů. Problematická ovšem zůstává otázka dlouhodobé léčby a nežádoucích účinků (136).

## 1.2. T regulační lymfocyty (Treg)

Rozhodující rysem imunitního systému je jeho schopnost rozlišovat mezi vlastním a cizím. Na základě této vlastnosti zabraňuje imunitní systém rozvoji autoimunity a zároveň je schopen efektivní odpovědi proti škodlivým mikroorganismům (104, 129). Mechanismus centrální tolerance na vlastní antigeny probíhá v thymu a v kostní dřeni. Nicméně, malé množství autoreaktivních lymfocytů může proniknout do periferie. Tyto autoreaktivní buňky se následně stávají subjektem mechanismů periferní tolerance, které zahrnují T buněčnou

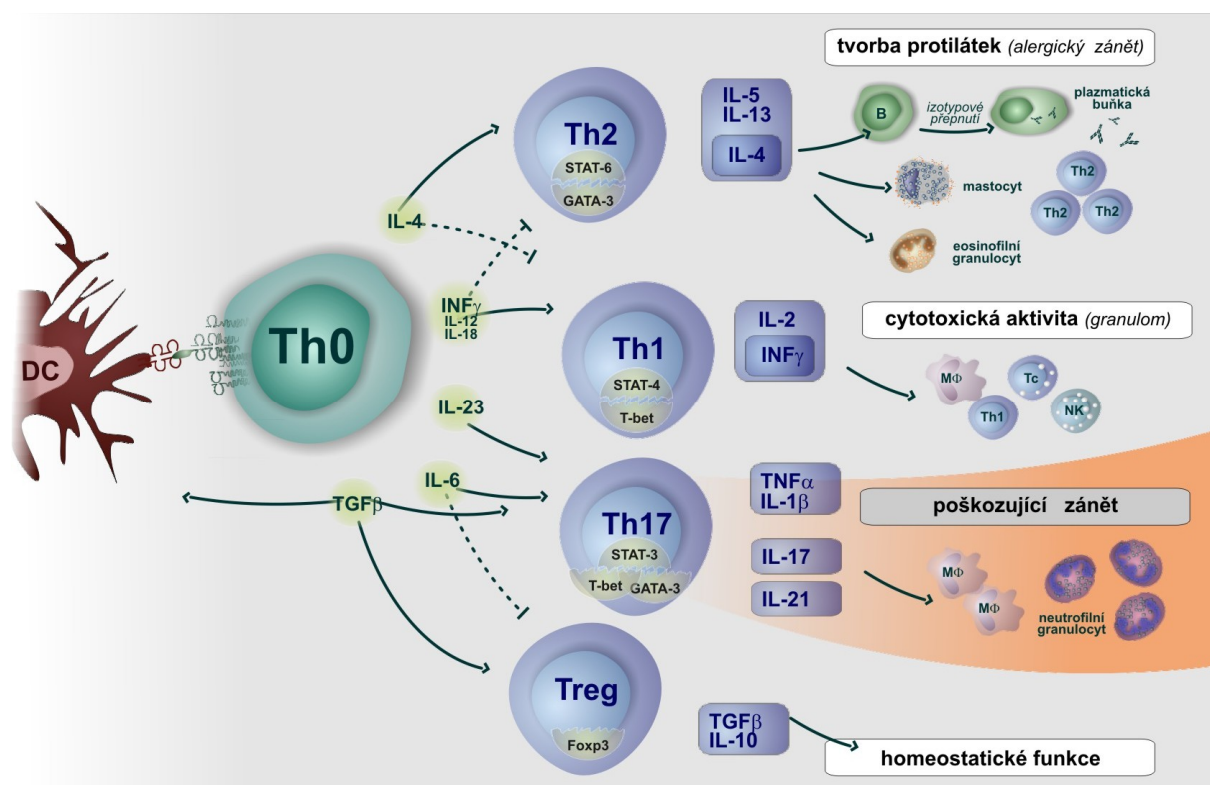
klonální delecii, anergii, ignoranci a supresi. Mechanismus suprese je založen na existenci T regulačních lymfocytů (74, 148, 157).

Na konci osmdesátých let 20. století, Mosmann a Coffman zavedli funkční kategorizaci Th lymfocytů (100). Rozdělili Th lymfocyty do dvou populací, které vykonávají své funkce pomocí různých cytokinů. Th1 lymfocyty sekretují INF- $\gamma$  a IL-2, zatímco Th2 produkují zejména IL-4, IL-5 a IL-13. Základní funkcí Th1 lymfocytů je aktivace makrofágů a cytotoxické odstranění intracelulárních parazitů. Dále se podílí na imunopatologických reakcích opožděného typu. Th2 subpopulace spolupracuje s B lymfocyty. Ty se následně diferencují v plazmatické buňky a produkují protilátky, včetně třídy IgE a takto se Th2 lymfocyty podílí na alergiích a obraně organismu proti parazitům. Vzájemná regulace aktivit Th1 a Th2 lymfocytů je velmi zásadní a jejich vzájemná rovnováha je nutná k efektivní imunitní odpovědi. Hlavním transkripčním faktorem Th1 lymfocytů je T-bet a Th2 je GATA3.

Gershon a Kondo poprvé popsali T regulační lymfocyty v roce 1971 a nazvali je supresorovými T buňkami (50). V roce 1995 Sakaguchi a spol. popsali subpopulaci CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> buněk (128). Tato nová podskupina T lymfocytů byla později nazvaná T regulační lymfocyty (Treg). Pro tyto buňky je typická přítomnost transkripčního faktoru FoxP3 (forkhead box P3). Tato specifická subpopulace buněk exprimuje ve vysoké denzitě molekulu CD25 a řadu dalších markerů, např. CTLA-4 (CD152), CD45RO, GITR, CD134 a LAG-3. Glukokortikoidy indukovaný receptor pro tumor nekrotizující faktor (GITR) je negativní regulátor Treg, zatímco CTLA-4 (cytotoxický s T lymfocyty asociovaný antigen) aktivuje supresorovou funkci těchto buněk (30). CTLA-4 může zprostředkovávat supresorové funkce pomocí snižování exprese kostimulačních molekul CD80 a CD86 na dendritických buňkách. Tato snížená exprese vyvolaná působením Treg může vést k menší aktivaci naivních T lymfocytů prostřednictvím CD28 a důsledkem tohoto procesu je imunologická suprese a tolerance (165).

Veldhoen a spol. a Bettelli a spol. nezávisle na sobě objevili vysoce prozánětlivou podskupinu Th buněk, která produkuje IL-17, a pojmenovali tyto buňky Th17 (12, 154). Je prokázáno, že Th17 buňky jsou odlišné od Th1, Th2 a Treg buněk a ovlivňují autoimunitu, imunitu proti plísním a extracelulárním patogenům, alergii, rozvoj nádorů a transplantaci orgánů. Diferenciace v Th17 buňky je způsobena přítomností TGF- $\beta$  a IL-6. Kromě role v diferenciaci Th17 je TGF- $\beta$  nezbytný také pro vývoj Treg buněk. TGF- $\beta$  v nízkých koncentracích v přítomnosti prozánětlivých cytokinů (IL-6, IL-21) indukuje expresi IL-23R a v přítomnosti IL-23 vede ke vzniku Th17. Ve vysokých koncentracích naopak podporuje

expresi FoxP3 a diferenciaci na Treg buněk. Pro vznik Th17 je nezbytný transkripční faktor STAT3. Signály zprostředkované STAT3 vedou k expresi hlavního transkripčního faktoru Th17 ROR $\gamma$ t (retinoid-related orphan receptor  $\gamma$ t). Th17 buňky produkují řadu cytokinů, např. IL-6, IL-17A, IL-17F, IL-20, IL-22, IL-26, a TNF- $\alpha$  (45, 77, 109) (Obr. 4).



**Obrázek č. 4.** Typy T lymfocytů a jejich základní funkční vlastnosti

### 1.2.1. Typy Treg lymfocytů

Je identifikována řada typů Treg lymfocytů, které můžeme dělit na přirozené CD4<sup>+</sup> Treg a adaptivní Treg lymfocyty (Tab č.2). Mezi adaptivní Treg lymfocyty patří Th3 buňky, Tr1 buňky a CD8<sup>+</sup> Treg. Velmi pravděpodobně budou v budoucnu objeveny další podskupiny Treg lymfocytů. T regulační lymfocyty vykonávají své supresorové funkce pomocí sekrece cytokinů (adaptivní Treg) nebo prostřednictvím buněčného kontaktu (přirozené Treg) (74, 75, 148). Přirozené Treg lymfocyty pocházejí z thymu. Po interakci jejich vysokoafinitních TCR s autoantigeny prezentovanými buňkami thymického epitelu získávají regulační fenotyp již v thymu. Adaptivní Treg získávají své imunosupresivní funkce



až v periférii. Vznikají z prekurzorových buněk pod vlivem cytokinů. V přítomnosti IL-10 a IFN- $\gamma$  se diferencují do Tr1, v prostředí TGF- $\beta$  do linie Th3 (21, 157).

Přirozené Treg lymfocyty představují 5 - 10% z celkového množství CD4<sup>+</sup> pomocných T lymfocytů u myši a okolo 1 - 5% u lidí. Jsou charakterizovány střední až vysokou expresí povrchové  $\alpha$  podjednotky IL-2 receptoru o molekulové hmotnosti 55kDa (CD25) a intracelulární expresí transkripčního faktoru FoxP3. Suprese těmito buňkami je závislá na buněčném kontaktu (148). K vykonání jejich supresorové funkce je nutná aktivace cestou TCR – jedná se o typické  $\alpha\beta$  vysokoafinitní T buněčné receptory (157).

Fenotyp Tr1 buněk je CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>. Tyto lymfocyty, aktivované pomocí TCR, produkují velké množství IL-10 a naopak nízké hladiny IL-2 (39). Battaglia a spol. dokázali, že Tr1 lymfocyty jsou důležité pro navození tolerance na vlastní i cizí antigeny, například antigeny z jídla (7). Tr1 působením IL-10 brání v proliferaci a cytokinové produkci efektorových buněk a zároveň inhibují funkci antigen prezentujících buněk (85).

Th3 buňky mají stejný fenotyp jako Tr1, ale jejich hlavním modulátorem je TGF- $\beta$ . K jejich vývoji je nutná přítomnost IL-4. Th3 lymfocyty pomáhají při syntéze IgA a chemotaxi leukocytů. Vykazují supresorové vlastnosti namířené proti Th1 a dalším imunitním buňkám. Produkce TGF- $\beta$  Th3 buňkami je velmi důležitá pro udržování tolerance na sliznicích (85, 157).

CD8<sup>+</sup> Treg lymfocyty jsou CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> a zastávají důležitou roli v obranné imunitě, zejména vůči intracelulárním infekcím. Rovněž se zapojují do mechanismů orální tolerance (15, 69, 156, 159).

TGF- $\beta$  zastává velmi důležitou roli jak u přirozených tak u adaptivních T regulačních lymfocytů. Je důležitý pro vznik, funkci a přežívání adaptivních Treg a zároveň udržuje potřebnou hladinu přirozených Treg v periferní krvi. Významnou roli má i IL-2. V nepřítomnosti tohoto cytokinu nemohou Treg lymfocyty přežívat ani zvyšovat své počty jak v thymu tak v periférii a nemohou působit supresivně na T lymfocytární proliferaci (85, 170). Kultivace nediferencovaných T lymfocytů současně se stimulací TCR v přítomnosti IL-2 a TGF- $\beta$  vede ke zvýšené expresi FoxP3 transkripčního faktoru a k přeměně naivních CD4<sup>+</sup> buněk na CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> supresorové lymfocyty. Takto indukované Treg jsou schopné potlačovat proliferaci efektorových T lymfocytů (72, 170).

Typ	Fenotyp	Původ	Typ supresorové funkce
přirozené Treg	CD4+CD25+FoxP3+	thymus	buněčný kontakt
adaptivní Tr1	CD4+CD25-FoxP3-	periferie	IL-10
adaptivní Th3	CD4+CD25-FoxP3-	periferie	TGF- $\beta$

**Tabulka č. 2** *Typy Treg lymfocytů*

### 1.2.2. Funkční vlastnosti Treg lymfocytů

Treg lymfocyty jsou charakterizované jako funkčně specializovaná subpopulace T lymfocytů, zodpovědná za optimalizaci imunitních odpovědí (56, 74, 160). Tyto buňky jsou schopné potlačovat nežádoucí aktivity autoreaktivních klonů T lymfocytů. Účastní se zahájení a udržení imunitní periferní tolerance rozpoznáním autoantigenů, které jsou uvolňovány z poškozených tkání, následně spouští imunitní odpověď, zprostředkovanou buď buněčným kontaktem nebo cytokiny (56, 129, 148, 155, 157). Tlumí nežádoucí aktivaci efektorových T lymfocytů na běžnou přirozenou mikroflóru a zároveň umožňují nezbytnou T lymfocytární aktivaci na akutní infekci (66, 77). Sakaguchi a spol. potvrdili, že Treg buněčná aktivita je regulována řadou kostimulačních interakcí a cytokinovým mikroprostředím jak v thymu tak v tkáních (128). T regulační lymfocyty projevují nejmocnější imunosupresivní potenciál mezi testovanými populacemi buněk (74).

Přirozené Treg lymfocyty jsou po stimulaci chemokiny a dalšími mediátory, které pochází z poškozené tkáně a ze zánětu, uvolňovány z thymu. Následně cíleně migrují do těchto míst a příslušných lymfoidních tkání (67). Jonuleit a spol. uvedli, že T regulačními lymfocyty zprostředkovaná imunosuprese je výsledkem jejich přímé spolupráce s efektorovými buňkami (74). Existuje názor, že Treg lymfocyty tlumí nadprodukcii IL-2, což vede k následnému snižování CD25 $\alpha$  podjednotky IL-2 receptoru. Toto je zpětná kontrola Treg buněčné aktivace (129, 148).

Vojdani a spol. publikovali, že Treg lymfocyty zajišťují předcházení autoimunity dvěma způsoby. První zahrnuje zabránění infiltrace a diferenciaci autoreaktivních T lymfocytů v lymfatických uzlinách. Treg přítomné v lymfatických uzlinách okolo dendritických buněk mohou bránit T lymfocytární aktivaci v počátečních stádiích. Druhý způsob T regulační suprese zahrnuje aktivaci, proliferaci a následné přemístění Treg lymfocytů do postižené tkáně a zde lokálně umírňují funkce efektorových buněk (160).

Dalším mechanismem působení T regulačních lymfocytů je jejich cytotoxická aktivita zprostředkovaná uvolňováním granzymů a perforinů (40). T regulační lymfocyty mohou touto cytotoxickou aktivitou regulovat řadu cílových buněk, např. CD4<sup>+</sup> a CD8<sup>+</sup> subpopulace (53, 59), NK a NKT buňky, monocyty, dendritické buňky a granulocyty (112, 119, 144, 151). Treg jsou schopné snižovat počet CD8<sup>+</sup> paměťových efektorových T lymfocytů (84, 112). Proto je pravděpodobné, že zvýšený počet kožních Treg lymfocytů může zeslabovat patogenní CD8<sup>+</sup> T lymfocytární funkce při zánětlivém procesu u psoriázy (90).

### **1.2.3. Detekce Treg lymfocytů**

V současné době je nejlepší metodou k identifikaci Treg lymfocytů průtoková cytometrie. Stanovení a analýza těchto buněk vyžaduje použití více markerů. Běžný přístup k identifikaci a izolaci Treg lymfocytů je stanovení CD4<sup>+</sup> a CD25<sup>+</sup> exprese. Nejvíce specifickým markerem pro detekci Treg lymfocytů pomocí průtokové cytometrie je FoxP3, který je lokalizovaný intracelulárně (39, 40, 129). Vzhledem k intracelulární lokalizaci transkripčního faktoru FoxP3 je jeho detekce možná pouze po permeabilizaci buněk. Permeabilizační krok je pro běžnou rutinní laboratorní praxi poměrně náročný a zdouhavý. Proto byla snaha nalézt jiný marker specifický pro detekci Treg lymfocytů. Nedávno došlo k objevu, že FoxP3 pozitivní buňky exprimují s výrazně nižší hustotou podjednotku IL-7 receptoru (CD127). Experimentálně bylo prokázáno, že CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>high</sup>/CD127<sup>low</sup> buňky jsou FoxP3 pozitivní Treg buňky. Nyní je obecně přijímáno, že tento fenotyp může sloužit jako náhradní marker pro Treg buňky (91, 161). Pro rutinní práci je CD25<sup>high</sup>/CD127<sup>low/-</sup> fenotyp dostatečně specifický a citlivý.

### **1.2.4. Treg lymfocyty u imunodeficiencí a imunopatologických chorob**

Defekt genu FoxP3 vede k nedostatečné produkci tohoto transkripčního faktoru, což vyvolává IPEX syndrom (imunitní polyendokrinopatie a enteropatie vázaná na X chromozom). Nedochází k supresi CD4<sup>+</sup> T lymfocytů, které se chovají autoreaktivně, a důsledkem je fatální autoimunitní choroba. Pro toto onemocnění je typická atrofie střevní sliznice s masivní T lymfocytární infiltrací, diabetes mellitus 1. typu, ekzém, anémie, infiltrace jater, trombocytopenie, tyreopatie a přítomnost řady autoprotilátek. Většina pacientů

umírá v kojeneckém věku. V současné době je jedinou možnou léčbou imunosuprese následována transplantací kostní dřeně (85, 106, 109).

Jedním z klíčových povrchových markerů Treg lymfocytů je CD25 molekula, alfa podjednotka receptoru IL-2. Nízká exprese CD25 molekuly způsobuje chronický zánět ve střevě a plicích. U CD25 deficitních pacientů nacházíme infekční komplikace podobné těm, které se vyskytují u pacientů s T lymfocytární imunodeficiencí. Mezi ně patří opakující se pneumonitida vyvolaná cytomegalovirem, kandidové infekce a chronické gastrointestinální choroby. Tito pacienti trpí záněty žlučového, ekzémy, hemolytickou anémií a hepatosplenomegalií (85, 109).

Nedostatek IL-10, který je klíčovým cytokinem Tr1 buněk, vede k nekontrolovatelnému zánětu na slizničních površích (85).

Poruchy v počtu nebo funkci Treg lymfocytů nacházíme u autoimunitních chorob, jako jsou roztroušená skleróza, diabetes mellitus 1. typu, myasthenia gravis, systémový lupus erythematosus, autoimunitní lymfoproliferativní syndrom, revmatoidní artritida, psoriáza a další (47, 78, 160).

Roztroušená skleróza je chronické autoimunitní onemocnění, při kterém dochází k demyelinizaci. Typickým znakem je zánět a infiltrace lymfocytů v centrálním nervovém systému. Snížený počet a/nebo nefunkčnost Treg lymfocytů může vést k nadměrné stimulaci CD4<sup>+</sup> efektorových buněk a tím k produkci prozánětlivých cytokinů (160). Diabetes mellitus 1. typu je chronická autoimunitní choroba, na jejímž vzniku se podílí Th1 lymfocyty. Dochází k destrukci  $\beta$  buněk Langerhansových ostrůvků slinivky břišní, což postupně vede k absolutnímu nedostatku inzulínu. Na patogenezi diabetu 1. typu se podílí zhoršená suprese efektorových CD4<sup>+</sup> a CD8<sup>+</sup> T lymfocytů. Tato nedostatečná suprese je způsobena poruchou různých imunoregulačních subpopulací, včetně NK buněk a Treg lymfocytů (160). Myasthenia gravis je autoimunitní onemocnění postihující nervosvalový přenos. Pacienti s touto chorobou prokazují výrazně sníženou schopnost suprese efektorových T lymfocytů. Tudiž, patogeneze a vývoj této choroby může být závislý na abnormální funkci Treg (160). Systémový lupus erythematosus a autoimunitní lymfoproliferativní syndrom jsou systémové chronické autoimunitní choroby. Bylo prokázáno, že snížený počet Treg lymfocytů je zapojený do jejich patogeneze (160, 166). Rvmatoidní artritida je chronické zánětlivé autoimunitní onemocnění doprovázené poškozením kloubů. V rozvoji této choroby hraje klíčovou roli přítomnost prozánětlivých cytokinů. Treg lymfocyty u pacientů s revmatoidní artritidou jsou schopné potlačovat proliferaci efektorových T lymfocytů, ale nejsou schopné tlumit produkci TNF- $\alpha$  a

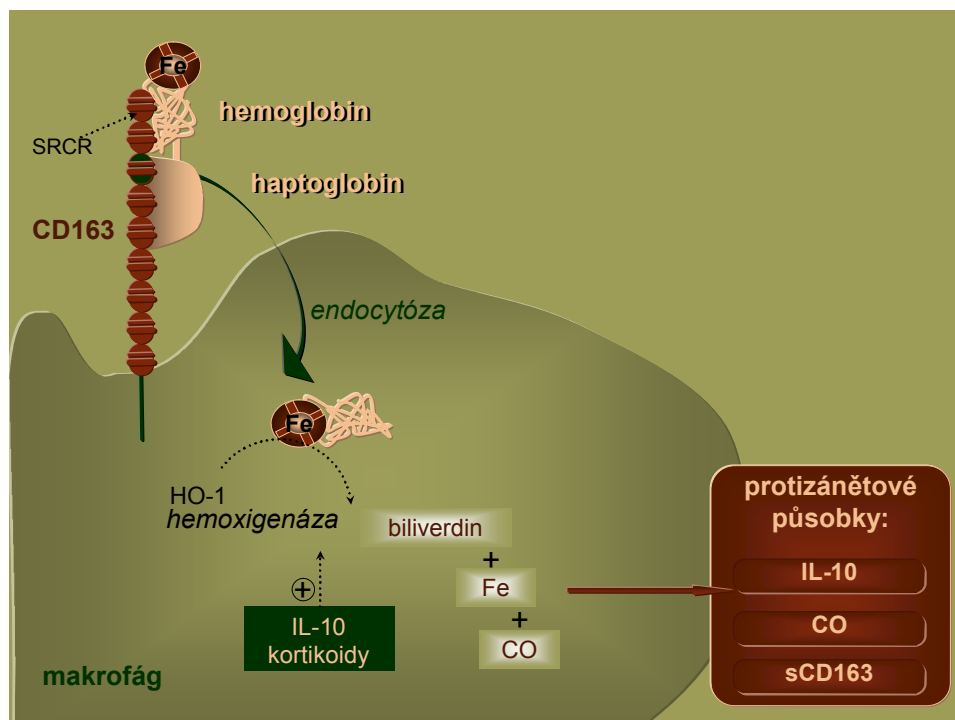
INF- $\gamma$  klíčových pro rozvoj poškozujícího zánětu. Tento fakt vede k předpokladu, že neschopnost Treg potlačovat cytokinovou produkci přispívá k etiologii revmatoidní artritidy. Bylo také prokázáno, že Treg lymfocyty u pacientů s revmatoidní artritidou jsou četnější v synoviální tekutině než v periferní krvi (160). Psoriáza je systémová, zánětlivá choroba s projevem na kůži. Treg u pacientů s psoriázou nejsou schopné regulovat efektorové T lymfocyty. Ačkoli se nejedná o absolutní poruchu této funkce, pro dostatečnou supresi imunopatologického procesu jsou potřeba vyšší počty Treg (28, 140). Z tohoto lze usuzovat, že Treg lymfocyty jsou zapojené do patogeneze psoriázy (90, 127, 140).

Treg lymfocyty jsou dobrým cílem pro zkoumání imunopatogeneze, diagnostiky, léčby a/nebo prevence imunitních chorob (30).

### **1.3. Vychytávací receptor CD163**

Receptor CD163 je transmembránový glykoprotein nalézáný výhradně na monocitech/makrofázích, který je důležitý k vychytávání komplexů haptoglobin-hemoglobin (Hp-Hb) (93, 105).

Monocyty a makrofágy zastávají velmi důležitou roli v udržování homeostázy, ale jsou také důležité v případě patologických stavů, jako jsou infekce, zánět, ateroskleróza a rakovina. Tkáňové makrofágy jsou buňkami fagocytujícími, účastní se jak na protilátce závislé tak nezávislé cytotoxicitě, jsou schopné degradovat jak vlastní tak exogenní struktury, odstraňují opotřebované erytrocyty, prezentují antigeny T lymfocytům, zajišťují interakce buněčným kontaktem a produkují prozánětlivé mediátory. Na svém povrchu exprimují Fc-receptory, receptory pro komplement, vychytávací receptory, adhezní molekuly a receptory pro solubilní mediátory (cytokiny, chemokiny, prostaglandiny a růstové faktory) (142). Makrofágy rozpoznávají molekulové vzory asociované s patogenem (PAMP) pomocí membránových a solubilních receptorů PRR (Pattern Recognition Receptor). Vychytávací receptory patří mezi tyto receptory pro patogenní vzory. Do skupiny vychytávacích receptorů se řadí SRCR (scavenger receptor cystein-rich) rodina, jejíž členem je molekula CD163.



**Obrázek č. 5.** Vazba komplexu Hp-Hb pomocí vychytávacího receptoru CD163

Makrofágy existují jako nejméně dva funkčně odlišné typy, které jsou aktivovány jako odpověď na různé stimuly. Zatímco klasicky aktivované M1 makrofágy jsou zapojené do prozánětlivých odpovědí, alternativně aktivované M2 makrofágy projevují protizánětlivé vlastnosti a podílí se na odstraňování částí poškozených buněk. K aktivaci M1 makrofágů dochází v prostředí IFN- $\gamma$ , a to buď samotného a nebo společně s mikrobiálními produkty (jako jsou např. lipopolysacharidy) nebo cytokiny (např. TNF). Makrofágy M1 mají dobrou schopnost prezentovat antigeny. M2 makrofágy jsou aktivovány v přítomnosti IL-4 a IL-13. Charakteristickým znakem M2 makrofágů je vysoká exprese CD163 (43, 64, 95, 96, 153). Monocyty se zvýšenou expresí CD163 se podobají těmto protizánětlivým makrofágům. Dá se předpokládat, že M2 makrofágy jsou přímo odvozené od CD163<sup>high</sup> monocytů.

### 1.3.1. Molekulární struktura

CD163 molekula je člen rodiny SRCR (scavenger receptor cystein-rich) (57, 171); konkrétně patří do skupiny B (79, 105, 110, 121). Bylo prokázáno, že řada SRCR-proteinů je přímo zapojena do vývoje imunitního systému a do regulace imunitní odpovědi. Skupina A

Srcr rodiny obsahuje 6 cysteinových zbytků v doméně a je kódována dvěma exony. Skupina B má 8 cysteinových zbytků a je kódována jedním exonem.

CD163 obsahuje 8 cysteinových zbytků na doménu, pouze v doméně 8 obsahuje jen 6 cysteinových zbytků (164). Extracelulární část receptoru CD163 se skládá z devíti Srcr-domén, následuje transmembránový řetězec složený z 24 aminokyselin a krátká cytoplazmatická část. CD163 gen se skládá ze 17 exonů a 16 intronů. Exon 1 zahrnuje start kodon a kóduje N-terminální část signálního peptidu. C-terminální část je kódována exonem 2 a dvěma nukleotidy exonu 3. Každá z devíti Srcr-domén CD163 receptoru je kódována samostatným exonem. Délka těchto exonů je v rozmezí 309 až 324 nukleotidů (110, 121). CD163 molekula existuje ve formě membránově vázaného proteinu a v solubilní formě (141).

### 1.3.2. Funkce CD163

Základní funkcí molekuly CD163 je vazba komplexu Hp-Hb (Obr. 5). Stárnoucí nebo poškozené červené krvinky jsou odstraňovány prostřednictvím makrofágů ve slezině, v játrech a v kostní dřeni. Intravaskulární hemolýza vede ke vzniku oxidovatelného potenciálně toxického volného hemoglobinu, který je v komplexu s haptoglobinem odstraněn pomocí makrofágů. CD163 receptor váže pouze komplexy Hp-Hb (93, 99). Naopak nedochází ke spojení se samotným hemoglobinem či haptoglobinem (23).

Haptoglobin patří mezi  $\alpha_2$ -globulinové proteiny krevní plasmy. Jedná se o tetramer obsahující 2  $\alpha$ - a 2  $\beta$ -řetězce. Fenotypicky byly identifikovány tři hlavní typy haptoglobinu – haptoglobin 1-1 (Hp1), haptoglobin 1-2 a haptoglobin 2-2 (Hp2), které se liší délkou  $\alpha$ -řetězce (87). CD163 má vyšší afinitu pro komplexy haptoglobin/hemoglobin-2 než pro haptoglobin/hemoglobin-1. CD163 receptor, který váže komplex haptoglobin/hemoglobin obsahující Hp1, stimuluje buňky k produkci protizánětlivých cytokinů, zejména IL-10. Naopak, CD163, který váže komplex haptoglobin/hemoglobin obsahující Hp2, nestimuluje buňky k produkci protizánětlivých cytokinů (60, 111, 139). Vazba komplexu Hp-Hb na receptor CD163 vyžaduje přítomnost  $\text{Ca}^{2+}$  iontů (83, 93).

Po endocytóze komplexu Hp-Hb je globulinová část odstraněna v lyzozomech a enzym hemoxygenáza (HO) působí na hem (37, 105, 171). Existují dva typy HO. HO-2 je přítomen za normálních fyziologických podmínek a HO-1, který vzniká na základě působení protizánětlivých stimulů (glukokortikoidy a IL-10) makrofágů. Hem se rozpadá na biliverdin,

volné železo a CO, které mají protizánětlivé účinky. Vazba Hp-Hb s CD163 vyvolává produkci cytokinů, včetně IL-10, což zpětně zvyšuje expresi CD163 a HO (133, 134).

Volný hemoglobin je toxický vlivem oxidativní hem části Hb a redoxivně působícího železa, proto je velmi důležité jeho rychlé odstranění z těla (57, 105, 162, 171). Zvýšená intravaskulární hemolýza, která je typická u řady dědičných, infekčních či autoimunitních chorob, může vést k vyčerpání haptoglobinu. Nedostatek haptoglobinu může vést k poškození tkání toxickým působením cirkulujícího hemoglobinu (57). Zvýšená exprese CD163, vyvolaná působením cytokinů nebo glukokortikoidů, přispívá k protizánětlivé odpovědi pomocí dvou mechanismů. První představuje molekulu CD163 jako solubilní faktor, který projevuje cytokinové funkce. Druhým mechanismem je vychytávání komplexů Hp-Hb pomocí CD163 molekuly a tím zabraňuje intoxikaci hemoglobinem a eliminuje toxické efekty volného hemu. Tento mechanismus také zabraňuje oxidativnímu stresu a poškození buněk (110).

Kromě důležité role v odstraňování volného hemoglobinu z plasmy, má CD163 také úlohu imunomodulační (93, 142). Imunologická funkce CD163 je v zásadě homeostatická. Tato molekula se účastní adheze monocytů na endotelové buňky, podílí se na regeneraci tkání a na indukci tolerance. Solubilní CD163 může potlačovat aktivaci a proliferaci T lymfocytů *in vitro*, a tím usnadňovat supresi zánětlivé odpovědi (42, 68, 110).

#### 1.3.4. Exprese CD163

Zvýšená exprese tohoto znaku je typická během vyžívání monocytů na makrofágy (171). Tkáňové makrofágy mají v porovnání s monocyty výrazně vyšší expresi CD163. Tento vychytávací receptor se vyskytuje téměř na všech CD14 pozitivních cirkulujících monocitech (142). CD163 pozitivní makrofágy se vyskytují během ozdravné fáze akutního zánětu, u chronického zánětu a během hojení tkání.

Exprese CD163 je kontrolována pro- a protizánětlivými stimuly. Prozánětlivé stimuly, jako jsou bakteriální lipopolysacharidy, tumor nekrotizující faktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) nebo interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), snižují expresi tohoto receptoru. Supresi jak membránové, tak solubilní formy CD163 vyvolává i působení TGF- $\beta$  (115). Na druhou stranu, interleukin 6 (IL-6), glukokortikoidy a protizánětlivý interleukin 10 (IL-10) rychle způsobují zvýšenou expresi CD163 (24, 57, 110, 121, 158). Exprese této molekuly je také velmi účinně vyvolána endogenními a exogenními kortikosteroidy.



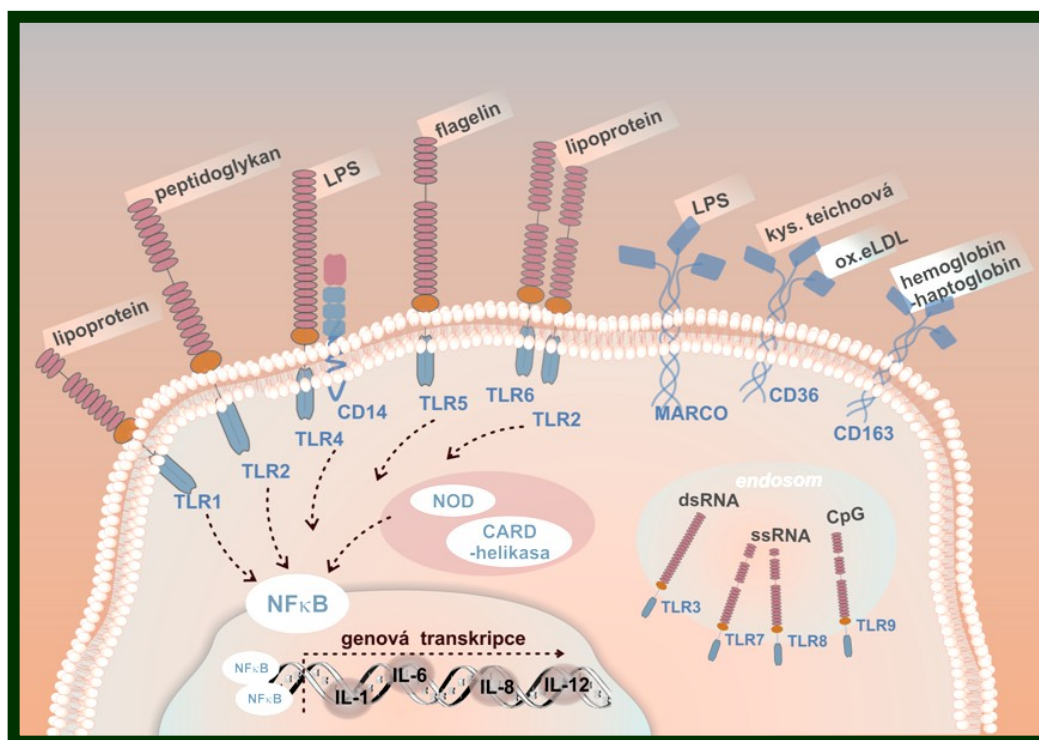
### **1.3.5. Solubilní forma CD163 (sCD163)**

CD163 se vyskytuje také jako solubilní protein v plasmě (sCD163). Jeho přítomnost v plasmě je způsobena proteolytickým štěpením membránové formy. Ke štěpení membránové CD163 vede přítomnost phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), lipopolysacharidů (LPS), metaloproteináz nebo stimulace FcγR. Štěpení je závislé na protein kináze C (65, 141, 143). Toto štěpení receptoru z membrán je neustálé, proto může plasmatická koncentrace receptoru odrážet celkovou hladinu exprese (57). Normální hladiny solubilní sCD163 v plasmě se pohybují mezi 0,73 a 4,69 mg/L, přičemž medián je 1,87 mg/L (42, 110). Solubilní forma sCD163 se nachází kromě plasmy i v dalších tělních tekutinách, jako je mozkomíšní mok, synoviální tekutina a ascitická tekutina (110, 141).

Podobně jako membránová forma, solubilní sCD163 také váže Hp-Hb komplexy, a tím se podílí na protizánětlivých regulačních reakcích (93, 110, 163). Během sepse, myeloidní leukémie a dalších stavů, které postihují aktivitu makrofágů, může hladina sCD163 mnohokrát vzrůst. Hladiny sCD163 jsou také zvýšené u revmatoidní artritidy, pneumonie, aterosklerózy, roztroušené sklerózy a po operaci srdce (80, 93, 110, 162, 163).

## **1.4. TLR receptory**

Okamžitá odpověď na mikrobiální invazi je zprostředkována vrozeným imunitním systémem. Ten následně upozorní adaptivní imunitní systém pomocí cytokinů, chemokinů a kostimulačních molekul. Toll-like receptory (TLR) jsou skupinou membránových glykoproteinů vrozeného imunitního systému a vyskytují se zejména na monocytech, makrofázích a dendritických buňkách. V menší míře jsou vyjádřené na epitelových a endotelových buňkách a adipocytech. Hrají důležitou roli v obraně proti patogenům a účastní se zánětlivých odpovědí. TLR patří mezi PRR (Pattern Recognition Receptor) a rozpoznávají molekulové vzory asociované s patogenem (PAMP) (9, 62, 131). Toll-like receptory existují kromě povrchové membránové formy také v podobě solubilní (33, 82, 88).



**Obrázek č. 6.** Vrozená imunita, Toll-like receptory a jejich ligandy

#### 1.4.1. Historie objevování TLR

U octomilky obecné (*Drosophila melanogaster*) byl dobře prozkoumán receptor zvaný Toll. Ten je důležitý při vývoji zárodku octomilky. Pokud je tento receptor během vývoje inaktivován, tak dochází k „zmatenému“ (německy „toll“) vývoji larvy. Na konci 20. století se zjistilo, že Toll receptor je v dospělosti u octomilky důležitý při obraně proti plísňovým a kvasinkovým infekcím. V roce 1997 bylo objeveno, že savčí homolog Toll receptoru (nyní značen TLR4) indukuje expresi genů zapojených v zánětu. Během několika let bylo u člověka objeveno deset receptorů sekvenčně podobných Toll, které byly pojmenovány TLR-1 až TLR-10 (5, 25, 145).

#### 1.4.2. Molekulární struktura TLR

Členové TLR rodiny se skládají z N-terminální extracelulární části bohaté na leucinové sekvence a intracelulární receptorové domény (Toll/IL-1R). Cytoplazmatická část je velmi podobná intracelulární doméně IL-1 receptorové rodině a proto je označována jako

Toll/IL-1 receptorová doména (TIR). Extracelulární část je odpovědná za rozpoznání ligandu, zatímco intracelulární doména zprostředkovává aktivaci signálních drah (5, 62, 108, 146). Stimulace TLR mikrobiálními složkami spouští expresi řady genů, které jsou zapojené do imunitních odpovědí. Signalizace vede k aktivaci transkripčního faktoru NFκB (nukleární faktor kappa B), který se následně přesune z cytoplasmy do jádra buňky. NFκB signalizační dráha prostřednictvím několika molekul jako jsou MyD88, TIRAP/Mal a TRIF ovlivňuje expresi zejména prozánětlivých cytokinů (TNF-α, IL-6, IFN-γ a IL-12), chemokinů a indukuje expresi kostimulačních molekul (CD80, CD86, CD40) a apoptózu (25, 26, 73, 82, 145). Uvolnění těchto prozánětlivých cytokinů a chemokinů vede k aktivaci T a B lymfocytů.

TLR1, TLR2 a TLR4 jsou vyjádřené na povrchu buněk, zatímco TLR3, TLR7, TLR8 a TLR 9 jsou intracelulární součástí endozómů (9, 62, 145). Membránové TLR identifikují extracelulární patogeny, zatímco nitrobuněčné receptory jsou zaměřené na intracelulární patogeny.

#### **1.4.3. Ligandy Toll-like receptorů**

Různé TLR receptory rozpoznávají specifické cizorodé molekuly (Obr. 6). TLR1 se váže na triacyllipopeptidy, typické pro mykobakterie. TLR2 rozpoznává řadu mikrobiálních částic. Jedná se zejména o lipoproteiny a lipopeptidy pocházející z různých patogenů, peptidoglykany a lipoteichovou kyselinu z grampozitivních bakterií a zymosan. Schopnost TLR2 rozpoznávat takto široké spektrum nebezpečných vzorů je pravděpodobně založena na tvorbě heterodimerů s dalšími TLR, zejména TLR1 a TLR6 (82, 145). Navíc bylo prokázáno, že je TLR2, stejně jako TLR4, zapojen do rozpoznávání LPS z gramnegativních bakterií (8). TLR3 aktivuje imunitní buňky v přítomnosti dvouvláknové RNA virů. TLR4 je společně s CD14 základním receptorem pro rozpoznávání lipopolysacharidů (LPS). Dalšími ligandy TLR4 jsou endogenní nebezpečné vzory DAMP proteiny tepelného šoku (HSP60 a HSP70), oligosacharidy kyseliny hyaluronové a fibrinogenu. Ve většině případů potřebuje jak TLR2 tak TLR4 k plně efektivnímu rozpoznání mikrobů přítomnost koreceptoru CD14. Typickým případem je rozpoznání LPS senzitivními buňkami. Nejdříve dojde pomocí LPS-binding proteinu k vytvoření komplexu LPS-CD14. Tento komplex spouští aktivaci TLR4. V nepřítomnosti CD14 jsou buněčné odpovědi proti mikrobům spuštěné pomocí TLR2 nebo TLR4 extrémně slabé (88). TLR5 rozpoznává flagelin, jeho působení je velmi důležité na slizničních površích. Ligandem pro TLR6 jsou lipopeptidy, lipoteichová kyselina a zymosan.

TLR7 a TLR8 jsou cílené na jednovláknovou RNA virů. TLR9 je receptorem pro nemetylované sekvence CpG v prokaryotické DNA. Ligandy pro TLR10 jsou neznámé (Tab. 3) (5, 9, 88, 108, 122, 145).

Receptory skupiny TLR	Ligand
TLR1	triacyllipopeptidy
TLR2	lipoproteiny, lipopeptidy, peptidoglykany, lipoteichová kyselina, zymosan, lipopolysacharidy, stresové proteiny
TLR3	dvouvláknová RNA
TLR4	lipopolysacharidy, proteiny tepelného šoku, oligosacharidy kyseliny hyaluronové a fibrinogenu
TLR5	flagelin
TLR6	lipopeptidy, lipoteichová kyselina, zymosan
TLR7	jednovláknová RNA
TLR8	jednovláknová RNA
TLR9	sekvence CpG v prokaryotické DNA
TLR10	neznámý

**Tabulka č. 3** *Ligandy TLR receptorů*

#### 1.4.4. Funkce a regulace Toll-like receptorů

Toll-like receptory hrají klíčovou roli ve vrozených imunitních funkcích. Rozpoznávají strukturálně konzervované molekuly cizorodých mikrobů. Navázání cizorodé molekuly na TLR spouští signální dráhu uvnitř buňky, na jejímž konci dochází zejména k produkci prozánětlivých cytokinů a chemokinů (118, 122). Tento proces vede k okamžité odpovědi na přítomnost cizorodých mikrobů. Nicméně, nadměrná produkce těchto prozánětlivých cytokinů vyvolaná působením TLR může vést k nežádoucím akutním nebo chronickým zánětům, septickému šoku a nebo i ke smrti. Proto musí být odpověď TLR regulována. Mezi základní mechanismy redukce exprese a funkce TLR patří například oddálení receptorů, destrukce aktivovaných buněk apoptózou, působení intracelulárních inhibitorů TLR signální cesty (MyD88s, IRAK2c, IRAK2d a další) a solubilní formy TLR (sTLR) (118).

TLR indukují různé odpovědi v závislosti na tom, na jakém typu buňky jsou dochází k jejich aktivaci. U dendritických buněk způsobují maturaci včetně zvýšené exprese MHC molekul II. třídy a kostimulačních molekul, produkci prozánětlivých cytokinů, změny v expresi receptorů pro chemokiny a posilují prezentaci antigenů. U leukocytů jsou TLR důležité pro produkci prozánětlivých cytokinů a antimikrobiálních produktů. TLR *in vitro* aktivují proliferaci B lymfocytů a napomáhají k diferenciaci na plazmatické buňky (62).

#### **1.4.5. Solubilní forma TLR2 (sTLR2)**

Solubilní TLR2 (sTLR2) se skládá zejména z TLR2 extracelulární domény a je uvolňován monocyty. Je přítomen v plasmě, mateřském mléce a ve slinách. Uvolňování sTLR2 je *in vitro* ovlivněno buněčnou aktivací a *in vivo* mykobakteriální infekcí. Buněčná aktivace vede k rychlému snižování povrchového TLR2 a uvolňování sTLR2 (88).

Předpokládá se, že sTLR2 má důležitou roli v předcházení nadměrného exprese a následné aktivace membránově vázané formy TLR. Solubilní forma sTLR2 receptoru je schopná narušit interakci TLR2 se svým koreceptorem CD14 tím, že se na něj naváže. Další možností regulace TLR2 odpovědi je schopnost sTLR2 se spojit s membránovou formou TLR2 nebo se navázat na mikrobiální složky, které jsou rozpoznatelné pomocí TLR2 a tím snižuje účinnost TLR2 signalizace. sTLR2 je také schopen ovlivňovat efektorové funkce, jako je fagocytóza a produkce superoxidu. Regulace pomocí sTRL2 je fyziologický mechanismus, který přispívá ke kontrolované a přesto efektivní odpovědi přirozené imunity na mikrobiální patogeny (33, 88, 118).

## 2. Cíle práce

Předkládaná práce je zaměřena na sledování dynamiky a intenzity exprese vybraných parametrů imunitního systému v průběhu Goeckermanovy terapie. Hlavním cílem je určit, jak různé buněčné populace přispívají do patogeneze psoriázy, zda hladina vybraných markerů koreluje s aktivitou choroby a jestli se mění v závislosti na terapii. Protože se ověřují nové terapie psoriázy, bylo by velmi přínosné nalézt spolehlivý biomarker aktivity choroby.

Hlavní cíle práce:

1. sledovat vybrané parametry imunitního systému u pacientů s psoriázou a porovnat naměřené výsledky s kontrolní skupinou zdravých dárců krve
2. zhodnotit vliv Goeckermanovy terapie na počet vybraných buněčných populací, povrchovou expresi a sérovou hladinu vybraných markerů imunitního systému
3. na základě výsledků navrhnout ukazatele vhodné pro monitorování úspěšnosti terapie a aktivity psoriázy

### **3. Metodika**

Práce vznikla za podpory grantů MZCR č. 00179906, MŠMT č. MSM0021620812, SVV-2011-262902 a programu PRVOUK P37/09.

#### **3.1. Soubor pacientů**

##### **3.1.1. Sestava pacientů s psoriázou pro analýzu T regulačních lymfocytů**

Do naší studie bylo přijato 27 dospělých pacientů trpících psoriázou. Naše studijní skupina se skládala z 16 žen a 11 mužů. Průměrný věk se pohyboval okolo  $44,5 \pm 22,7$  let. Průměrná doba Goeckermanovy terapie byla 15 dní.

19 zdravých dárců krve (6 žen, 13 mužů, průměrný věk  $38,9 \pm 10,9$  let) sloužilo jako kontrolní skupina.

Do našeho výzkumného souboru nebyli zařazeni pacienti s předchozí expozicí dehtu, PAU, UV záření či RTG záření a dále pacienti, kteří mají nesnášenlivost UV záření či dehtových preparátů. Tyto údaje byly zjišťovány pomocí dotazníků a dermatologickým vyšetřením.

Studie byla schválena Etickou komisí Fakultní nemocnice v Hradci Králové. Každý pacient i zdravý dárců krve podepsal informovaný souhlas.

##### **3.1.2. Sestava pacientů s psoriázou pro analýzu solubilní formy vychytávacího receptoru sCD163**

Solubilní forma vychytávacího receptoru sCD163 byla stanovena v séru 71 pacientů s psoriázou. Z nich bylo 33 žen a 38 mužů. Průměrný věk byl  $39,3 \pm 19,0$  let. Průměrná délka Goeckermanovy terapie byla 20 dní.

Kontrolní skupinu tvořilo 57 zdravých dobrovolníků, dárců krve. Jejich průměrný věk byl  $38,4 \pm 13,3$  let. V kontrolní skupině bylo 29 žen a 28 mužů.

sCD163 byla změřena před a po terapii. Naměřené výsledky byly porovnány s kontrolní skupinou.

Studie byla schválena Etickou komisí Fakultní nemocnice v Hradci Králové. Každý pacient i zdravý dárce krve podepsal informovaný souhlas.

### **3.1.3. Sestava pacientů s psoriázou pro analýzu povrchové formy vychytávacího receptoru CD163**

Do studované skupiny bylo zařazeno 40 pacientů s psoriázou (23 mužů, 17 žen). Průměrný věk byl  $38,3 \pm 19,1$  let. Průměrná délka Goeckermanovy terapie se pohybovala okolo 22 dní.

Kontrolní skupinu tvořilo 25 zdravých dárců krve. Jejich průměrný věk byl  $39,6 \pm 10,8$  let. V kontrolní skupině bylo 18 mužů a 7 žen.

Expresí CD163 na monocytech byla hodnocena před a po terapii. Výsledky byly porovnány s podskupinou kontrol.

Studie byla schválena Etickou komisí Fakultní nemocnice v Hradci Králové. Každý pacient i zdravý dárce krve podepsal informovaný souhlas.

### **3.1.4. Sestava pacientů s psoriázou pro analýzu povrchové TLR2 a TLR4 a solubilní sTLR2**

TLR2, TLR4 a sTLR2 receptor byl stanoven u 20 pacientů s psoriázou. Naše studijní skupina se skládala z 9 žen a 11 mužů (průměrný věk  $38,0 \pm 17,9$  let). Průměrná doba Goeckermanovy terapie byla 18 dnů.

Kontrolní skupinu tvořilo 20 zdravých dárců krve (10 žen a 10 mužů). Jejich průměrný věk byl  $37,0 \pm 10,3$  let.

Povrchová exprese TLR2 a TLR4 na monocytech byla stanovena před a po terapii. Naměřené výsledky u pacientů s psoriázou byly porovnány s expresí u kontrolní skupiny. sTLR byla rovněž u pacientů s psoriázou změřena před a po terapii a následně porovnány s hladinami u zdravých dárců krve.

Studie byla schválena Etickou komisí Fakultní nemocnice v Hradci Králové. Každý pacient i zdravý dárce krve podepsal informovaný souhlas.



### 3.2. Goeckermanova terapie

Goeckermanova terapie byla každému pacientovi indikována dermatologem individuálně na základě aktivity choroby. Účinnost a objektivizace terapie byla stanovena podle zarudnutí, zánětlivé infiltrace a šupinatostí lézí použitím PASI skóre (Psoriasis Area Severity Index). Pro každého pacienta bylo PASI vypočítáno před a po skončení léčby. Pokud jsme dosáhli snížení PASI o 30%, byla GT ukončena.

Goeckermanova terapie je kombinací fototerapie s lokální aplikací dehtu. Nemocnému je každý večer aplikována dehtová mast obsahující 5% farmaceutický uhelný dehet (pix lithantracis) na postižená místa kůže (10 - 75% povrchu těla). Mast se nechá působit přes noc a ráno je odstraněna pomocí olejové lázně. Následně je pacient ozářen UV zářením.

Byla provedena i objektivizace dávky UV záření, kterou pacienti obdrželi v průběhu léčby. Dle spektrometrické analýzy použitého UV zářiče je intervalová hustota zářivého toku ve vzdálenosti 100 cm před zářičem  $134,45 \mu\text{W}/\text{cm}^2$  pro vlnovou délku 280 - 315 nm a  $245,6 \mu\text{W}/\text{cm}^2$  pro vlnovou délku 315,5 - 400 nm. K dispozici byla i spektra hustot zářivého toku, ze kterých bylo možno odečíst hodnoty intenzit pro užší spektrální oblasti. Účinná intenzita záření ( $\text{W}/\text{cm}^2$  vztažená k vlnové délce 270 nm) byla počítána jako součet součinů intenzit záření v dílčích spektrálních oblastech od 180 do 400 nm ( $\text{W} \times \text{cm}^{-2} \times \text{nm}^{-1}$ ), relativních spektrálních účinností a šířek dílčích spektrálních oblastí (nm). Dávky záření byly vypočítány vynásobením účinné intenzity záření ( $1,478 \times 10^{-5} \text{ W}/\text{cm}^2$ ) dobou expozice. Doby expozice UV záření byly individuální a byly ordinovány vzestupně podle vývoje onemocnění během léčby. Doba ozáření se pohybovala od 1 do 20 minut/den. Denní dávka ozáření se u sledovaných pacientů pohybovala mezi hodnotami  $0,8868 \text{ mJ}/\text{cm}^2$  (1 minuta) a  $17,736 \text{ mJ}/\text{cm}^2$  (20 minut). Pro kvantifikaci rizika byla použita limitní hodnota pro pracovní prostředí  $3 \text{ mJ}/\text{cm}^2$ , doporučovaná jako ochrana před akutními účinky vedoucími ke vzniku erytému a fotokeratitidy. Delší doby expozice tento limit překračovaly zhruba šestinásobně, nejkratší dosahovaly 30% limitu. Pro dané podmínky Goeckermanovy metody dávkový limit naplňovaly zhruba 3,4 minuty expozice.

Pacienti byli zařazeni do naší studie pouze tehdy, jestliže splňovali určitá kritéria. Zejména nepřítomnost interagujících faktorů expozice (např. souběžná či předcházející sekundární expozice UV záření, dehtu, RTG záření, PAU) a stav onemocnění, vylučující GT (nesnášenlivost UV záření či dehtových preparátů). Tyto údaje byly zjišťovány pomocí dotazníků a odborným dermatologickým vyšetřením.

### 3.3. Odběr vzorků

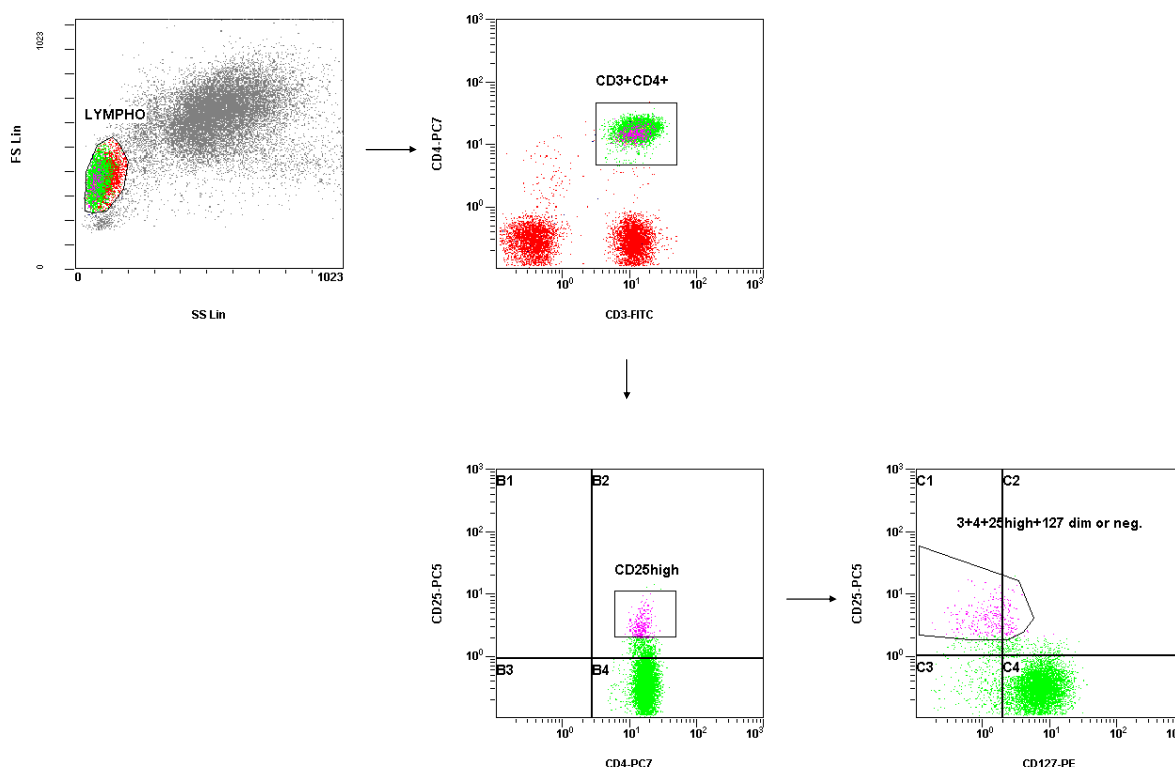
Vzorky krve z kubitální vény byly od pacientů léčených Goeckermanovou terapií odebrány do odběrových zkumavek s citrátem sodným (BD Vacutainer®, Becton Dickinson) před začátkem léčby a v den propuštění z nemocniční péče. Ve stejných časových intervalech byla odebrána i srážlivá krev pro separaci séra a sérum bylo zmraženo na  $-80^{\circ}\text{C}$ . Před vlastním zpracováním byly vzorky rozmrazeny při pokojové teplotě. Srážlivá i nesrážlivá krev byla odebrána i od zdravých dárců krve, kteří sloužili jako kontrolní skupina.

### 3.4. Laboratorní metody

#### 3.4.1. Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie je metoda, která umožňuje měření řady parametrů na velkém množství buněk během jejich průchodu laserovým paprskem. Nejčastěji měřenými parametry jsou rozptyl světla v malém úhlu, tzv. forward scatter (přímo úměrný velikosti buněk), rozptyl světla v  $90^{\circ}$  úhlu, tzv. side scatter (granularita částic) a fluorescence různé vlnové délky.

Imunofluorescenční analýza Treg lymfocytů byla provedena pomocí průtokového cytometru FC500 Cytomics (Beckman Coulter). Byl použit 4 barevný panel protilátek (Immunotech): CD3-FITC/CD127-PE/CD25-PC5/CD4-PC7. Naměřená data byla analyzována použitím softwaru CXP (Beckman Coulter). Treg buňky byly charakterizovány  $\text{CD3}^+\text{CD4}^+\text{CD25}^{\text{high}}\text{CD127}^{\text{low/-}}$  expresí (obr. 7).



**Obrázek č. 7** Strategie gatování k identifikaci Treg lymfocytů. Periferní krev zdravých kontrol a pacientů s psoriázou byla značena protilátkami proti CD3, CD127, CD25 a CD4. Nejdříve jsme si ohraničili populaci lymfocytů pomocí SS (side scatter) a FS (forward scatter) dot plotu (gate A). K selekci CD3+CD4+ populace jsme použili protilátky CD3 a CD4 (gate B). S pomocí protilátky CD25 jsme gatovali populaci CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> buněk (gate C). A nakonec pomocí protilátky CD127 jsme definovali populaci CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD127<sup>low/-</sup> buněk - Treg lymfocyty (gate D)

Analýza povrchové molekuly CD163 byla provedena pomocí průtokového cytometru FACSCalibur (Becton Dickinson) opatřeným argonovým laserem. K ovládání cytometru, akvizici, uchovávání a analýze dat byl použit softwarový program CELLQuests<sup>TM</sup> (Becton Dickinson). K detekci byla použita tříbarevná analýza s využitím monoklonálních protilátek, konjugovaných s FITC, PerCP a APC. Byl použit 3-barevný panel protilátek: CD163-FITC (Trillium Diagnostics) /CD14-PerCP (BD Biosciences) /CD3-APC (Beckman Coulter).

Expres povrchové formy TLR2 receptoru byla naměřena pomocí průtokového cytometru FACSCalibur (Becton Dickinson). Byl použit 3-barvený panel protilátek: TLR2-PE (Serotec) /CD14-PerCP (BD Biosciences) /CD3-APC (Beckman Coulter).

Expres povrchové formy TLR4 receptoru byla hodnocena pomocí průtokového cytometru FACSCalibur (Becton Dickinson) s použitím 3-barevného panelu protilátek: TLR4-PE (Serotec) /CD14-PerCP (BD Biosciences) /CD3-APC (Beckman Coulter).

Cytometrická analýza byla provedena ze vzorku plné krve odebrané do citrátu sodného (BD Vacutainer®, Becton Dickinson). Zpracování vzorků bylo provedeno hned po náběru. Značení monoklonálními protilátkami bylo provedeno standardním postupem: 25 µl krve inkubováno s 5 µl protilátky 15 minut při laboratorní teplotě. Následovala 10ti minutová lýza erytrocytů (OptiLyseC Lysing Solution, Beckman Coulter) a poté přidání fyziologického roztoku. Takto připravené vzorky byly analyzovány pomocí průtokového cytometru.

### **3.4.2. ELISA technika**

ELISA techniku vyvinuli a vytvořili Peter Perlmann a Eva Engvall na Stockholmské Univerzitě, Švédsko. Komercializace testů ELISA začala během let 1960 a 1970. ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) je jednou z nejpoužívanějších imunologických metod sloužících k detekci solubilních markerů. Tato metoda je založena na detekci solubilních faktorů imunochemickou cestou pomocí dvojice specifických protilátek namířených proti různým epitopům na stanovované molekule. V 96 jamkových polystyrénových mikrotitračních destičkách je na dno každé jamky absorbována první protilátka. Následuje navázání stanovované molekuly ze vzorku na tuto protilátku a poté vizualizace pomocí druhé protilátky značené enzymaticky. Enzym přeměňuje přidáný substrát na barevný produkt. Výsledné zbarvení je úměrné koncentraci stanovovaného proteinu. Vzniklé zbarvení je měřeno spektrofotometricky.

Hladina solubilní sCD163 byla detekována pomocí komerčního diagnostického ELISA kitu Macro163<sup>TM</sup> (IQ Products, Nizozemí). Test byl proveden podle pokynů poskytnutých výrobcem. Spektrofotometrické měření bylo realizováno pomocí ELISA readeru Multiscan RC (Thermo Scientific) s 450nm filtrem.

Hladina solubilní formy sTLR2 receptoru byla změřena pomocí diagnostického ELISA kitu pro lidský Toll-like receptor 2 (TLR2) (Usen Life Science Inc., Čína). Test byl

proveden podle pokynů doporučených výrobcem. Spektrofotometrické měření bylo realizováno pomocí ELISA readeru Multiscan RC (Thermo Scientific) s 450nm filtrem.

### **3.5. Statistická analýza**

Po zhodnocení normality dat, byly statistické rozdíly mezi skupinami a mezi pacienty před a po terapii hodnoceny párovým a nepárovým t-testem, případně neparametrickým Wilcoxonovým testem (MedCalc software, Belgie). Nepárový t-test a chi-square byl použit k vyloučení matoucích vlivů věku a pohlaví mezi pacienty a kontrolami.

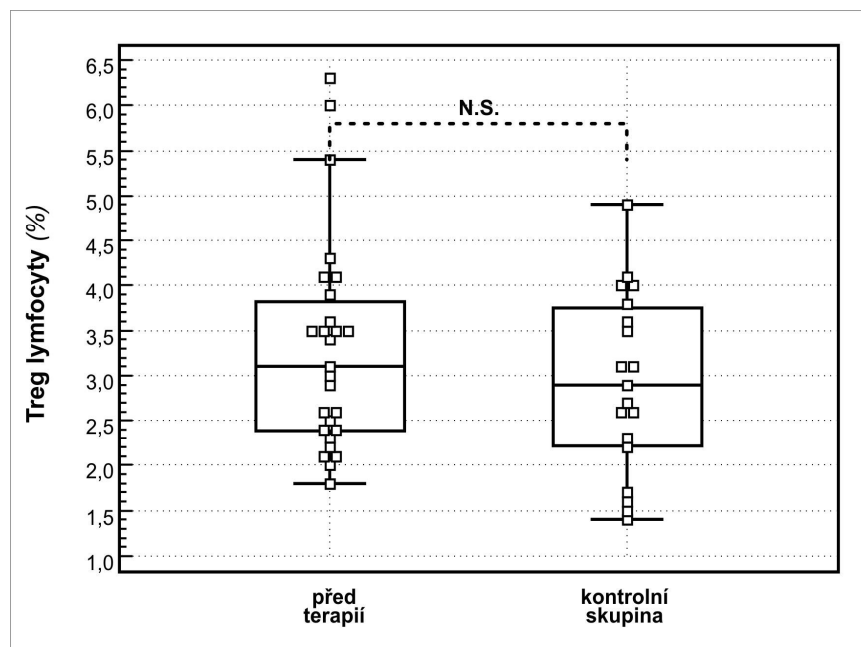
Výsledky Treg, povrchové CD163 a solubilní sTLR2 jsou uvedeny jako průměr  $\pm$  standardní odchylka a jako medián (nejnižší až nejvyšší kvartil) u s CD163 analýzy a membránové formy TLR2 a TLR4 na monocytech. P hodnoty menší než 0,05 byly považovány za statisticky významné.

## 4. Výsledky

### 4.1. Stanovení relativního počtu Treg lymfocytů u pacientů s psoriázou léčených Goeckermanovou terapií

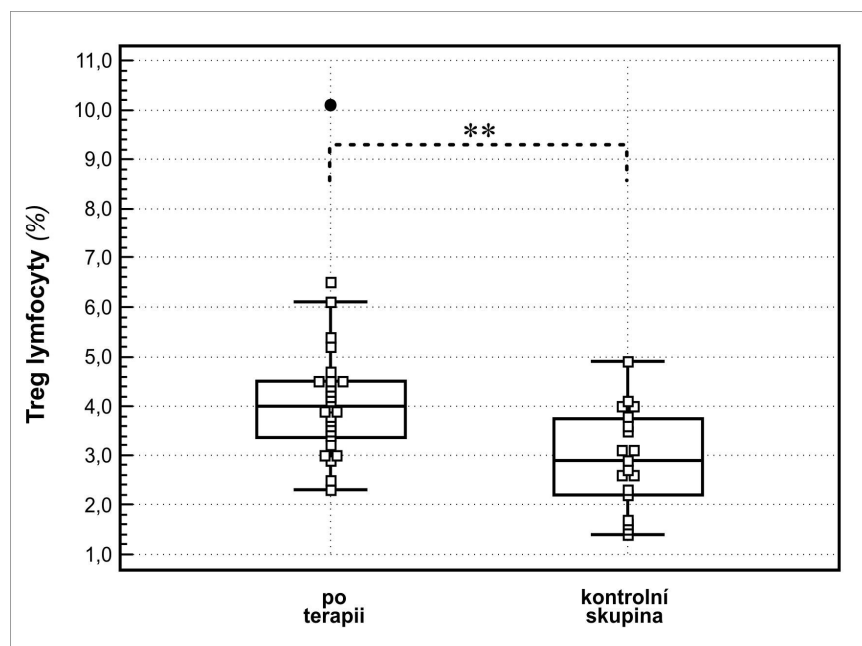
Relativní počty T regulačních lymfocytů byly stanoveny ve skupině 27 pacientů s psoriázou. Goeckermanova terapie významně pozitivně ovlivnila aktivitu choroby. U všech pacientů bylo dosaženo dobré klinické odpovědi. PASI skóre naměřené před terapií pokleslo z  $17,5 \pm 6,5$  na  $8,4 \pm 4,6$  po terapii ( $P < 0,0001$ ). Nebyly prokázány žádné statisticky významné korelace mezi počty T regulačních lymfocytů a aktivitou nemoci vyjádřenou jako PASI skóre.

Při porovnávání hladin Treg lymfocytů v periferní krvi mezi zdravými kontrolami ( $2,9 \pm 1,0\%$ ) a pacienty s psoriázou před zahájením terapie ( $3,3 \pm 1,2\%$ ) jsme nenalezli statisticky významné rozdíly ( $P = 0,2668$ ) (Graf 1 a 4).



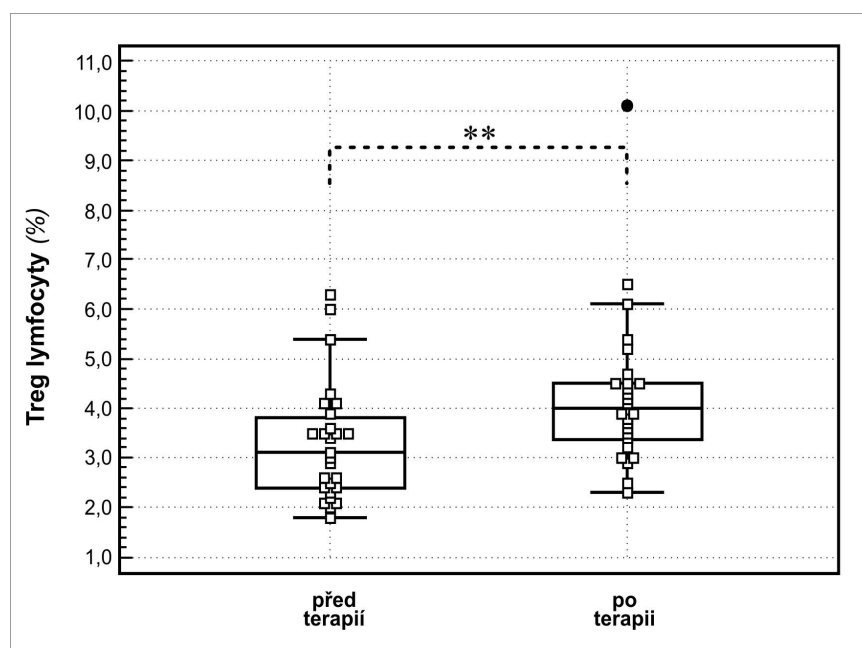
**Graf č. 1:** Srovnání procentuálního zastoupení Treg lymfocytů u pacientů s psoriázou před zahájením terapie s hodnotami u zdravým dobrovolníků ( $P = 0,2668$ ).

Relativní počet Treg lymfocytů v periferní krvi pacientů s psoriázou po GT ( $4,3 \pm 1,6\%$ ) byl významně vyšší v porovnání s počtem těchto buněk u kontrolní skupiny ( $2,9 \pm 1,0\%$ ),  $P = 0,0019$  (Graf č.2).



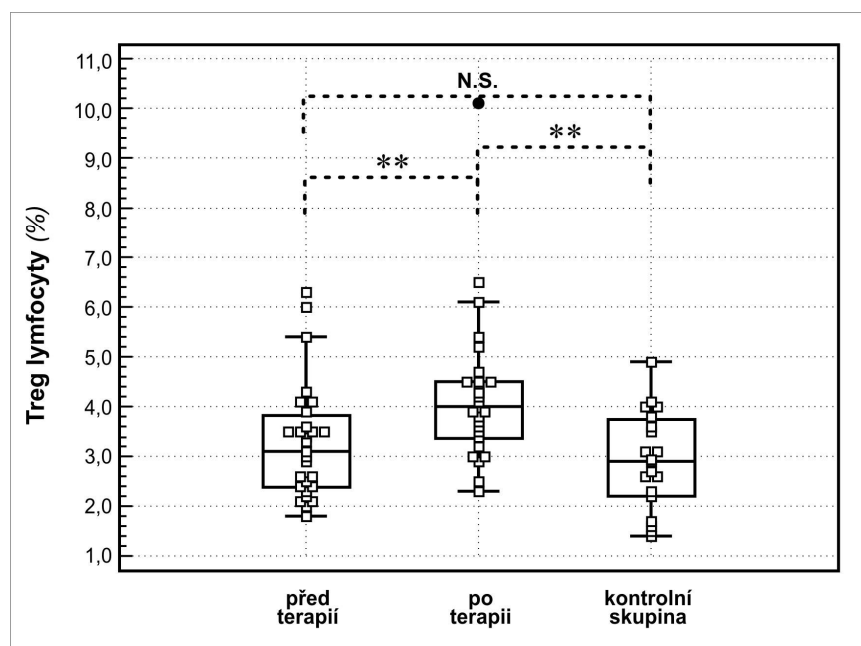
**Graf č. 2:** Srovnání procentuálního zastoupení Treg lymfocytů u pacientů s psoriázou po terapii s hodnotami u zdravým dobrovolníků ( $P = 0,0019$ ).

Relativní počet Treg lymfocytů byl u pacientů s psoriázou po GT ( $4,3 \pm 1,6\%$ ) statisticky významně vyšší než před zahájením terapie ( $3,3 \pm 1,2\%$ ),  $P = 0,0042$  (Graf 3).



**Graf č. 3:** Vzestup procentuálního zastoupení Treg lymfocytů v průběhu Goeckermanovy terapie ( $P = 0,0042$ ).

Naše výsledky jsou shrnuty v grafu č. 4.



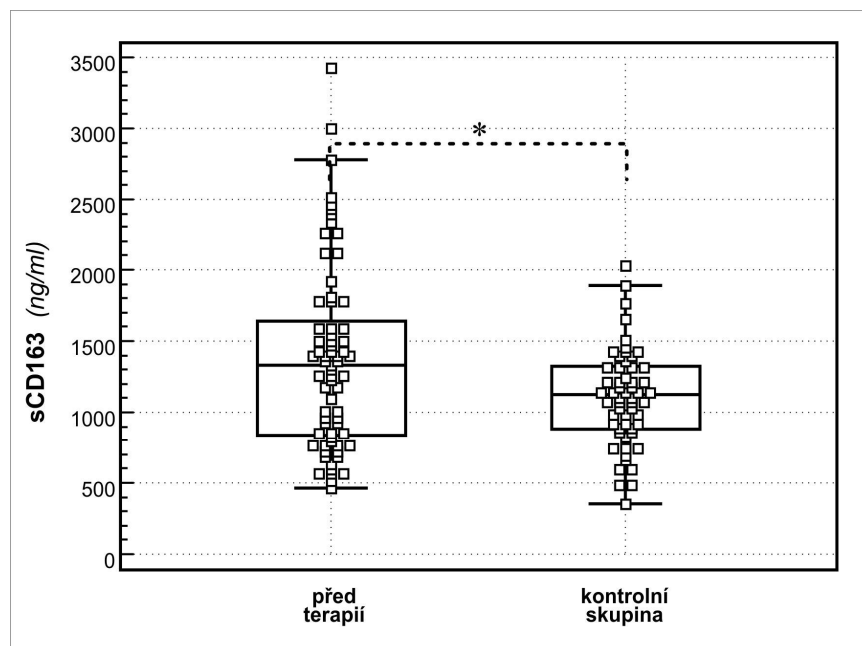
**Graf č. 4:** Procentuální zastoupení Treg lymfocytů u pacientů s psoriázou před a po GT a u zdravých dobrovolníků.

#### 4.2. Stanovení hladin solubilní formy CD163 (sCD163) u pacientů s psoriázou léčených Goeckermanovou terapií

Solubilní forma CD163 (sCD163) byla stanovena v sérech 71 dospělých pacientů s psoriázou. Všichni měli pozitivní odezvu na léčbu. Hodnoty PASI skóre poklesly z počáteční hodnoty  $19,3 \pm 7,0$  na  $10,1 \pm 6,4$  po terapii ( $P = 0,0001$ ). Nebyly prokázány žádné statisticky významné korelace mezi sérovými hladinami sCD163 a aktivitou nemoci vyjádřenou jako PASI skóre.

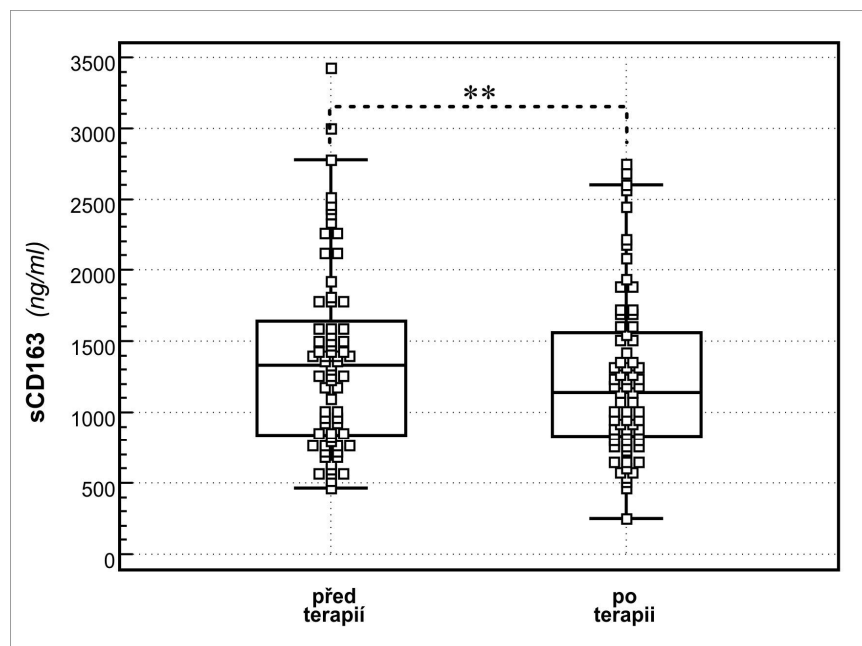
V porovnání s hladinou u kontrol ( $1128,0 \text{ ng/ml}$  ( $887,8 - 1325,0$ )) byly sérové hladiny sCD163 u pacientů před terapií ( $1363,0 \text{ ng/ml}$  ( $852,5 - 1778,5$ )) značně vyšší ( $P = 0,0154$ ) (Graf 5).





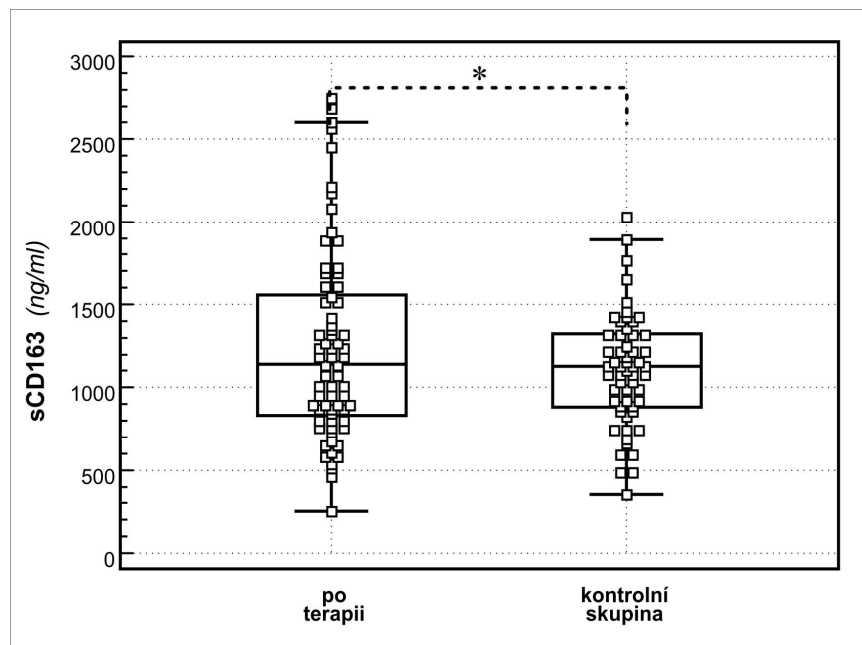
**Graf č. 5:** Srovnání sérových hodnot vychytávacího receptoru sCD163 u pacientů s psoriázou před zahájením terapie s hodnotami u zdravých dobrovolníků ( $P = 0,0154$ ).

Hladina sCD163 byla silně ovlivněna Goeckermanovou terapií. Sérové hladiny klesly z 1363,0 ng/ml (852,5 – 1778,5) před terapií na 1182,0 ng/ml (850,0 – 1610,3) po terapii ( $P = 0,0037$ ) (Graf 6).



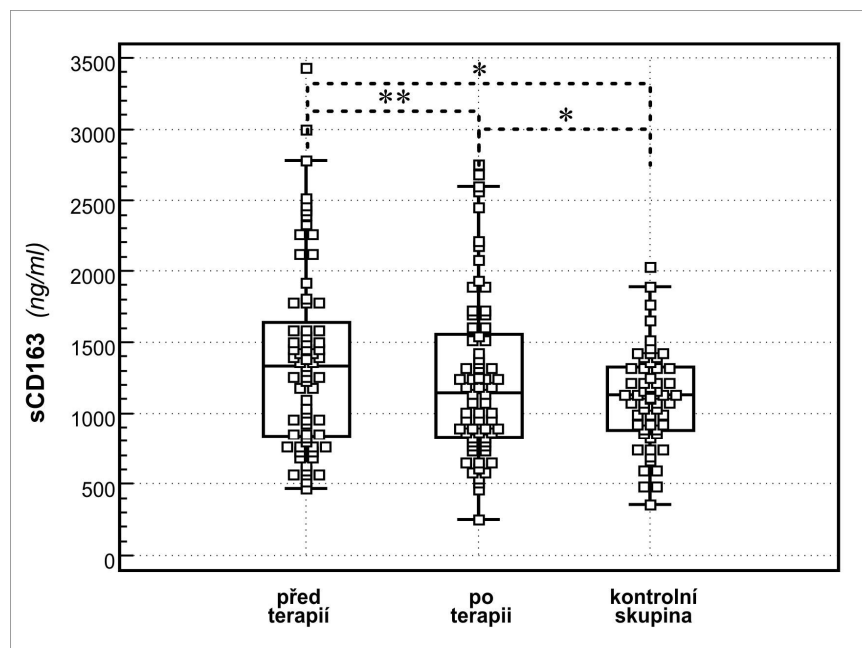
**Graf č. 6:** Pokles hladin sCD163 po Goeckermanově terapii ( $P = 0,0037$ ).

V porovnání se zdravými kontrolami (1128,0 ng/ml (887,8 – 1325,0)) zůstaly sérové hladiny sCD163 u pacientů s psoriázou po GT (1182,0 ng/ml (850,0 – 1610,3)) nepatrně zvýšené ( $P = 0,0459$ ) (Graf 7).



**Graf č. 7:** Srovnání sérových hodnot vychytávacího receptoru sCD163 u pacientů s psoriázou po terapii s hodnotami u zdravých dobrovolníků ( $P = 0,0459$ ).

Výsledky týkající se hladin solubilní CD163 u pacientů s psoriázou a kontrolní skupiny jsou shrnuty v grafu č. 8.

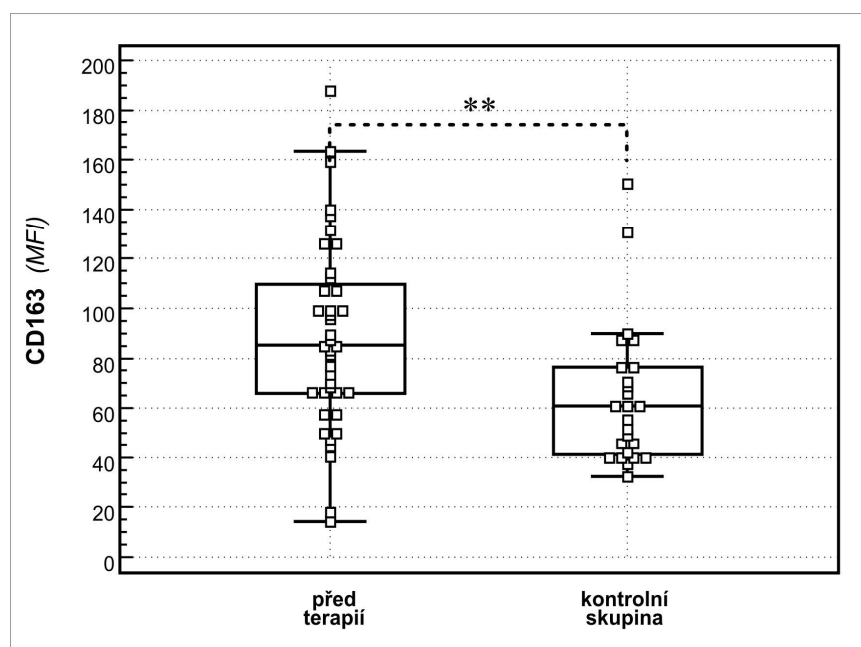


**Graf č. 8:** Sérové hladiny sCD163 a pacientů s psoriázou před a po GT a kontrolní skupiny.

#### 4.3. Stanovení exprese povrchové formy CD163 na monocytech u pacientů s psoriázou léčených Goeckermanovou terapií

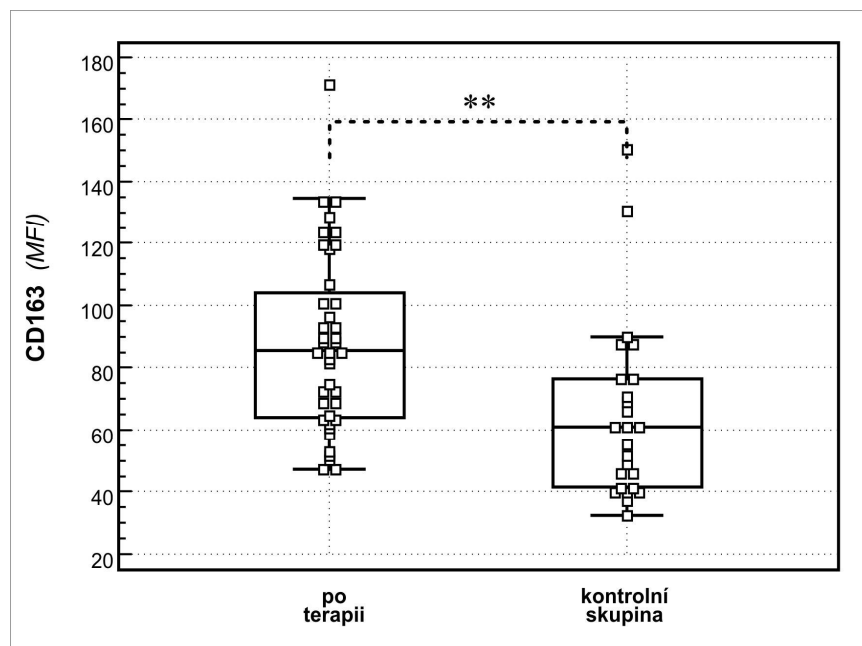
Terapeutický efekt GT byl velmi vysoký. U všech pacientů byla dosažena dobrá klinická odpověď. Došlo k výraznému snížení PASI z  $18,2 \pm 6,8$  před terapií na  $8,5 \pm 4,0$  po léčbě ( $P = 0,0001$ ). Nebyly prokázány žádné statisticky významné korelace mezi intenzitou fluorescence membránové exprese CD163 a aktivitou nemoci vyjádřenou jako PASI skóre.

V porovnání s kontrolami ( $64,5 \pm 28,6$ ) byla intenzita membránové exprese CD163, vyjádřená jako MFI, u pacientů s psoriázou před Goeckermanovou terapií ( $88,9 \pm 38,2$ ) významně vyšší;  $P = 0,0078$  (Graf 9).



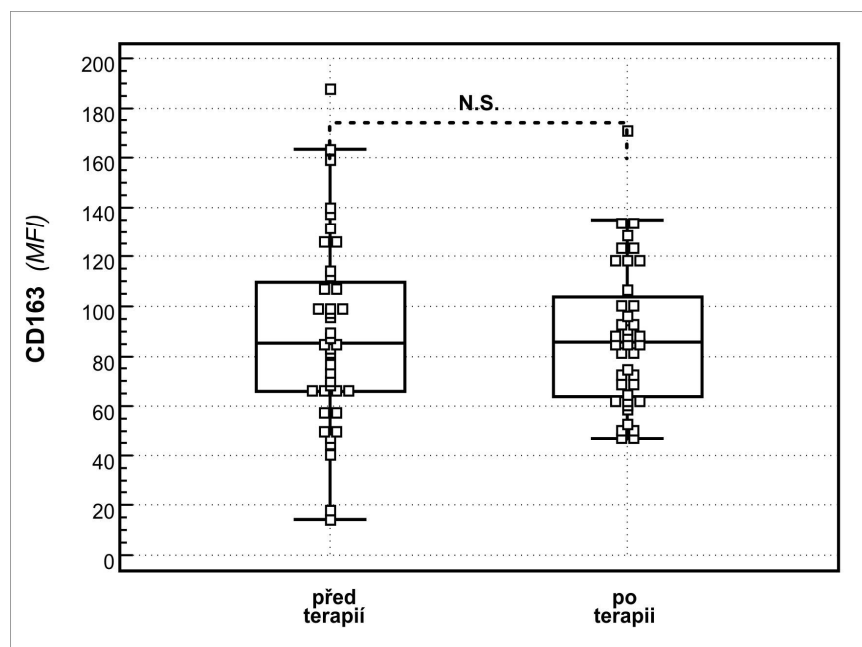
**Graf č. 9:** Srovnání membránové exprese CD163 na monocytech u pacientů s psoriázou před zahájením terapie s hodnotami u zdravým dobrovolníkům ( $P = 0,0078$ ).

Exprese membránové formy CD163 zůstala v porovnání s kontrolní skupinou ( $64,5 \pm 28,6$ ) významně vyšší i po Goeckermanově terapii ( $88,1 \pm 28,5$ );  $P = 0,0019$  (Graf 10).



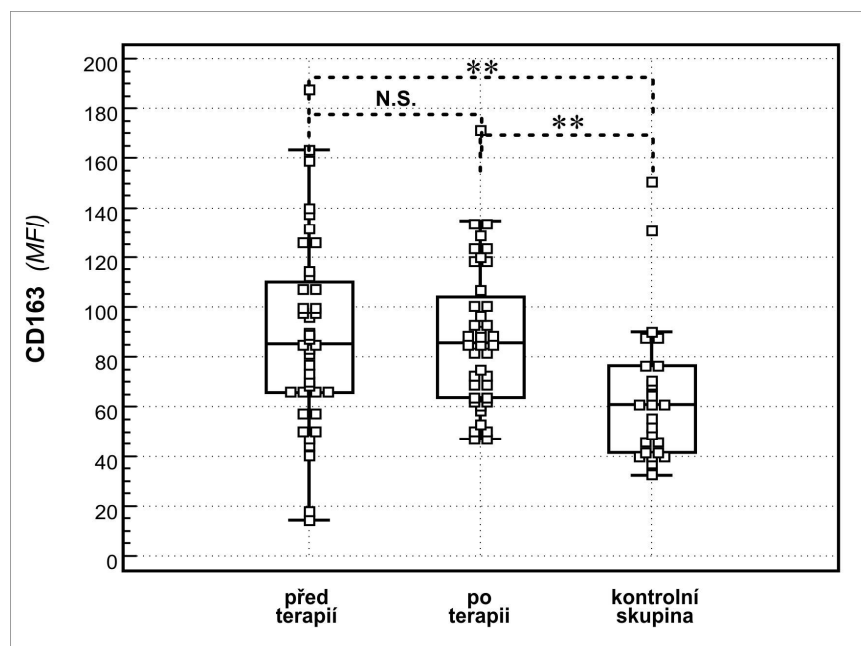
**Graf č. 10:** Srovnání membránové exprese CD163 na monocitech u pacientů s psoriázou po terapii s hodnotami u zdravých dobrovolníků ( $P = 0,0019$ ).

Exprese membránové CD163 na monocitech nebyla významně ovlivněna GT ( $P = 0,8666$ ) (Graf č. 11).



**Graf č. 11:** Membránová exprese CD163 na monocitech u pacientů s psoriázou před a po Goeckermanově terapii.

Výsledky týkající se membránové exprese CD163 na monocytech u pacientů s psoriázou a kontrolní skupiny jsou shrnuty v grafu č. 12.

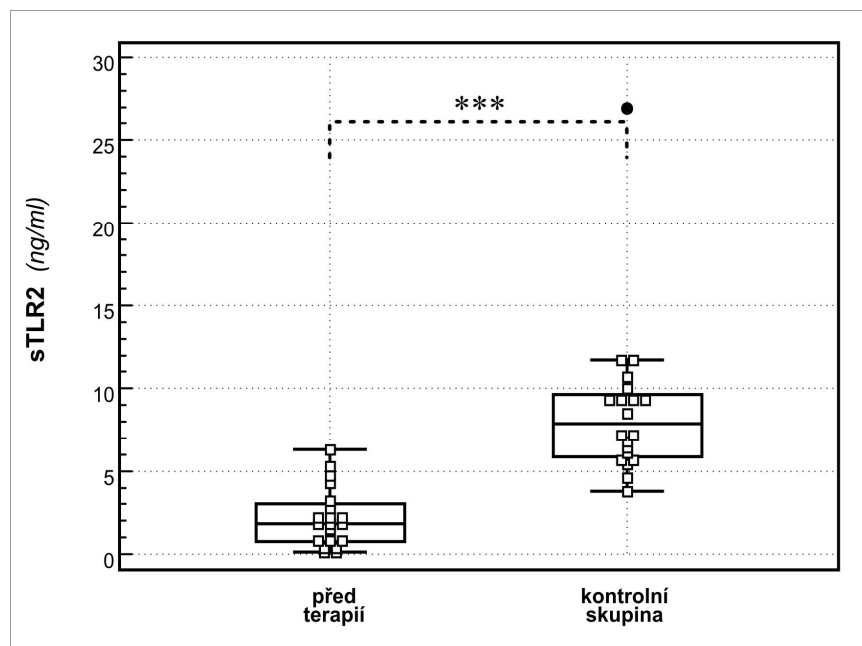


**Graf č. 12:** Membránová exprese CD163 na monocytech u pacientů s psoriázou před a po GT a kontrolní skupiny.

#### 4.4. Stanovení hladin solubilní formy TLR2 (sTLR2) u pacientů s psoriázou léčených Goeckermanovou terapií

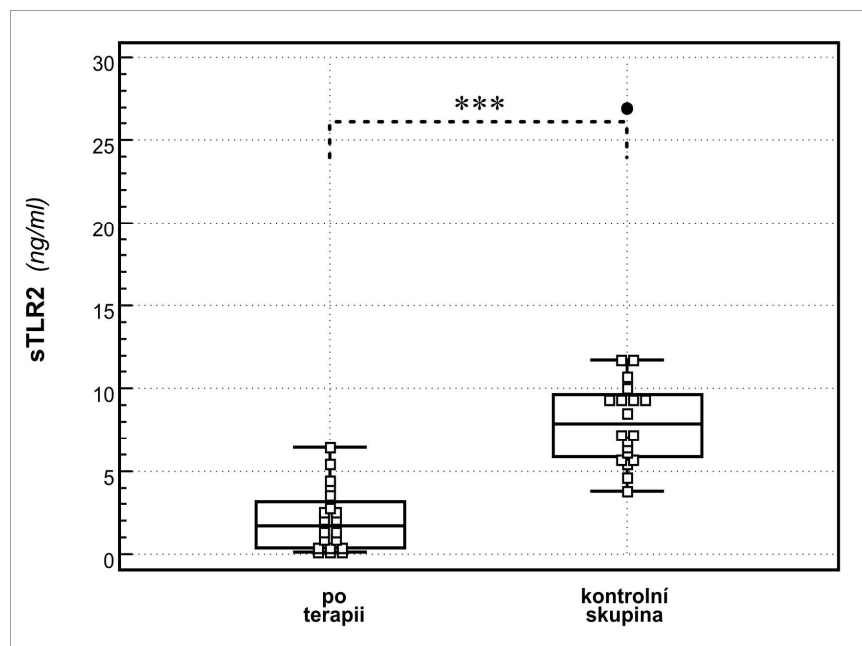
Solubilní forma TLR2 (sTLR2) byla stanovena v sérech 20 dospělých pacientů s psoriázou. Všichni měli pozitivní odezvu na léčbu. Hodnoty PASI skóre poklesly z počáteční hodnoty  $18,6 \pm 7,2$  na  $8,0 \pm 3,7$  po terapii ( $P < 0.0001$ ). Nebyly prokázány žádné statisticky významné korelace mezi sérovými hladinami sTLR2 a aktivitou nemoci vyjádřenou jako PASI skóre.

V porovnání se sérovou hladinou u kontrol ( $8,8 \pm 4,8$  ng/ml) byly sérové hladiny sTLR2 u pacientů s psoriázou před terapií ( $2,2 \pm 1,8$  ng/ml) značně nižší ( $P < 0.0001$ ) (Graf 13).



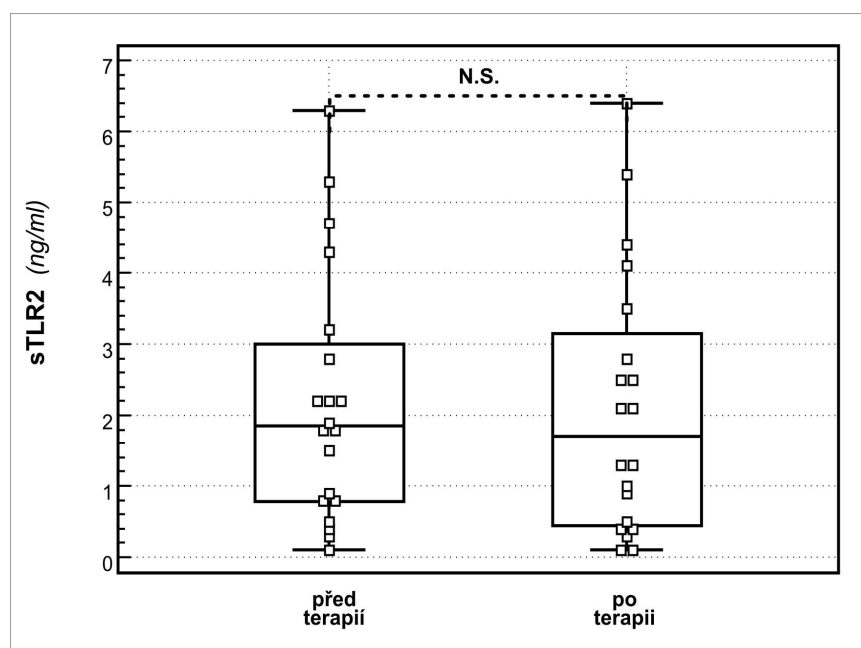
**Graf č. 13:** Srovnání sérových hodnot Toll-like receptoru 2 u pacientů s psoriázou před zahájením terapie s hodnotami u zdravých dobrovolníků ( $P < 0.0001$ ).

Hladiny sTLR2 u pacientů s psoriázou zůstaly v porovnání s kontrolní skupinou ( $8,8 \pm 4,8$  ng/ml) významně nižší i po ukončení Goeckermanovy terapie ( $2,1 \pm 1,8$  ng/ml);  $P < 0,0001$  (Graf 14).



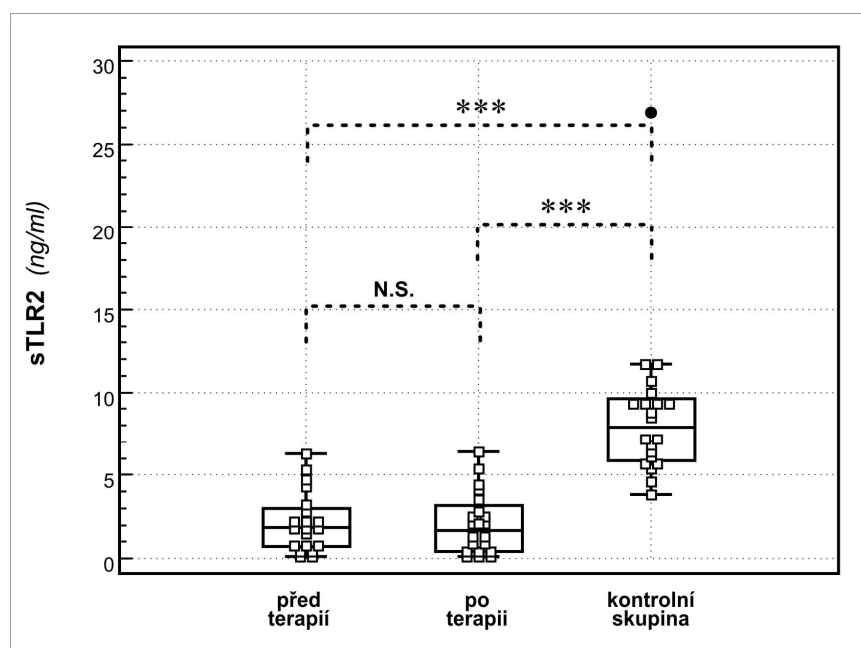
**Graf č. 14:** Srovnání sérových hodnot Toll-like receptoru 2 u pacientů s psoriázou po terapii s hodnotami u zdravých dobrovolníků ( $P < 0.0001$ ).

Goeckermanova terapie neměla žádný signifikantní vliv na sérové hladiny solubilní formy Toll-like receptoru 2 ( $P = 0,7322$ ) (Graf 15).



**Graf č. 15:** Srovnání sérových hodnot Toll-like receptoru 2 u pacientů s psoriázou před a po terapii ( $P = 0,7322$ ).

Výsledky týkající se hladin solubilní formy TLR2 receptoru u pacientů s psoriázou a kontrolní skupiny jsou shrnuty v grafu č. 16.

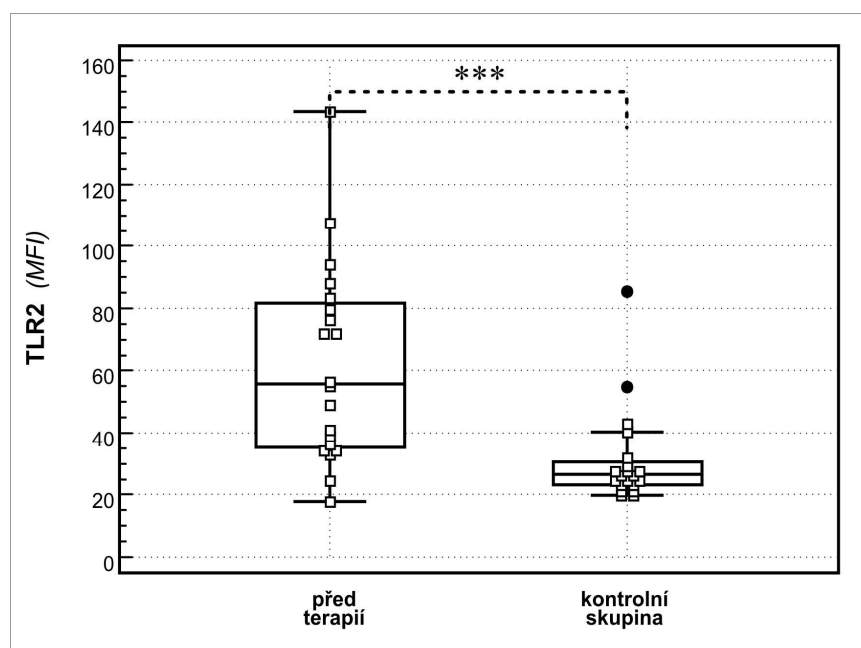


**Graf č. 16:** Sérové hladiny sTLR2 u pacientů s psoriázou před a po GT a kontrolní skupiny.

#### 4.5. Stanovení exprese povrchové formy TLR2 na monocytech u pacientů s psoriázou léčených Goeckermanovou terapií

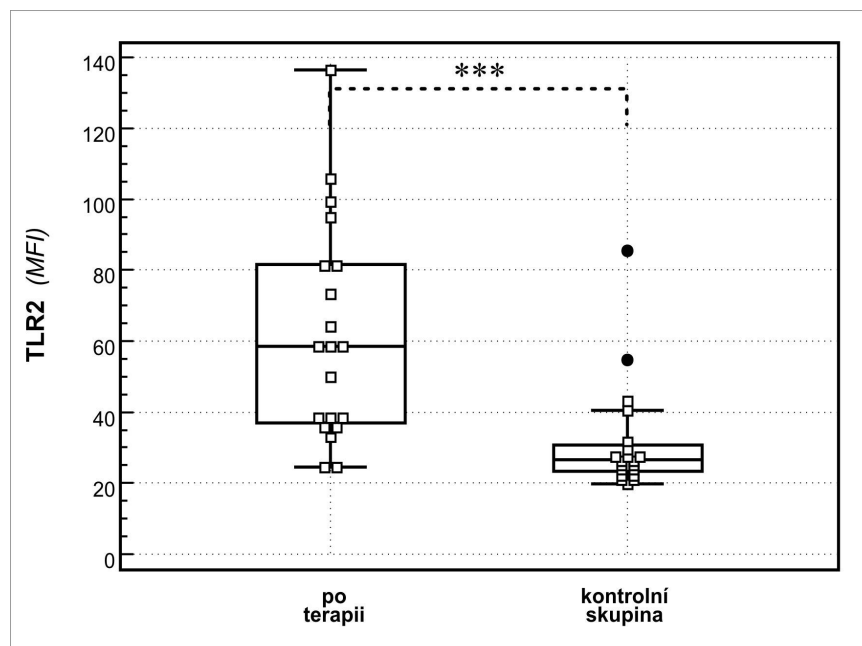
Terapeutický efekt GT byl velmi vysoký. U všech pacientů byla dosažena dobrá klinická odpověď. Hodnoty PASI skóre poklesly z počáteční hodnoty  $18,6 \pm 7,2$  na  $8,0 \pm 3,7$  po terapii ( $P < 0.0001$ ). Nebyly prokázány žádné statisticky významné korelace mezi TLR2 a aktivitou nemoci vyjádřenou jako PASI skóre.

V porovnání s hladinou exprese TLR2 na monocytech u kontrolní skupiny ( $26,5$  ( $23,4 - 30,6$ )) byla intenzita membránové exprese (MFI) TLR2 u pacientů s psoriázou jak před Goeckermanovou terapií ( $55,8$  ( $35,5 - 81,6$ ),  $P = 0,0003$ ) tak po ukončení léčby ( $58,6$  ( $37,2 - 81,5$ ),  $P = 0,0001$ ) významně vyšší (Graf 17, 18).



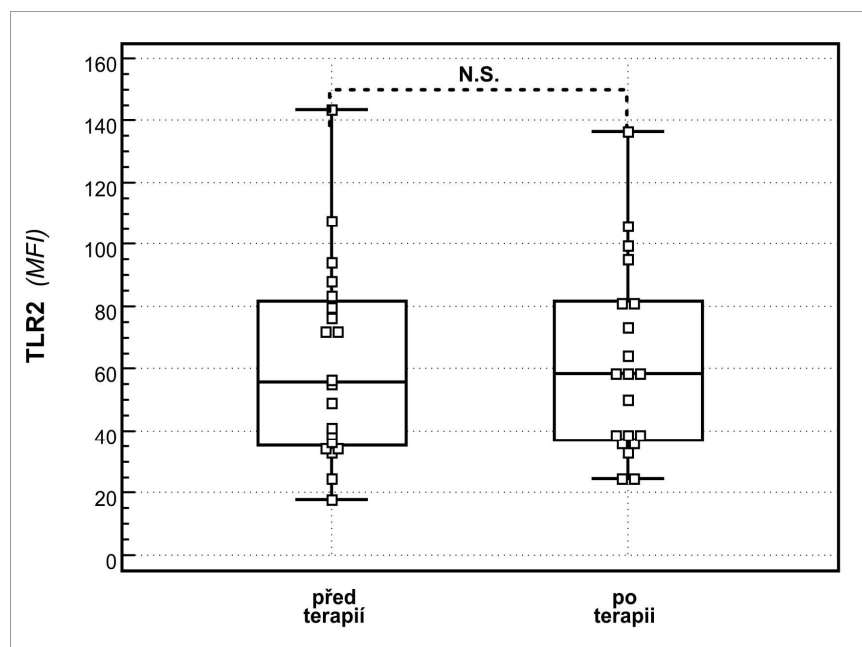
**Graf č. 17:** Srovnání membránové exprese TLR2 na monocytech u pacientů s psoriázou před zahájením terapie s hodnotami u zdravým dobrovolníků ( $P = 0,0003$ ).





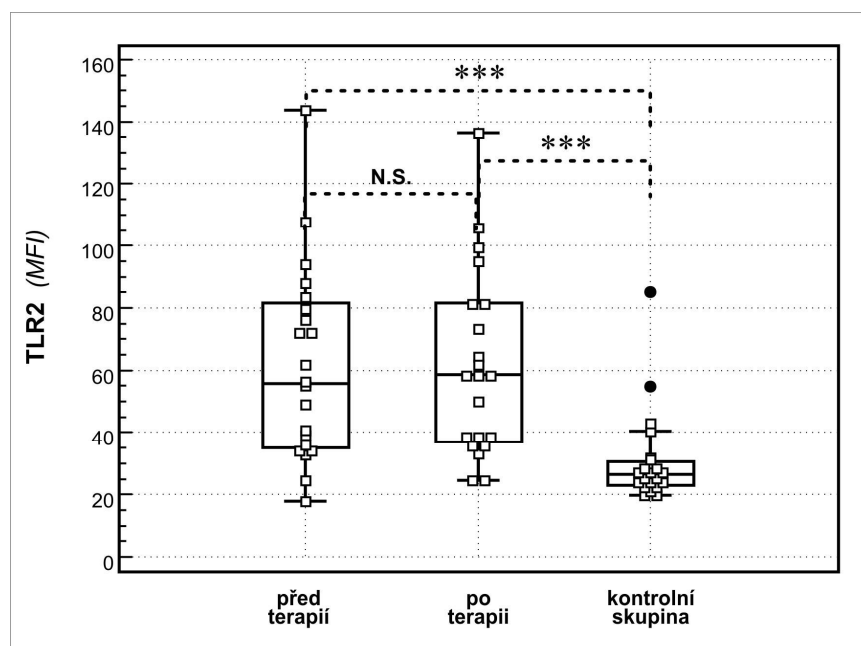
**Graf č. 18:** Srovnání membránové exprese TLR2 na monocyttech u pacientů s psoriázou po terapii s hodnotami u zdravým dobrovolníků ( $P = 0,0001$ ).

Expres membránové formy TLR2 nebyla ovlivněna Goeckermanovou terapií ( $P = 0,9836$ ) (Graf 19).



**Graf č. 19:** Expres TLR2 na monocyttech u pacientů s psoriázou před a po Goeckermanově terapii ( $P = 0,9836$ ).

Naše výsledky týkající se membránové exprese TLR2 jsou shrnuty v grafu č. 20.



**Graf č. 20:** Membránová exprese TLR2 na monocytech u pacientů s psoriázou před a po GT a kontrolní skupiny.

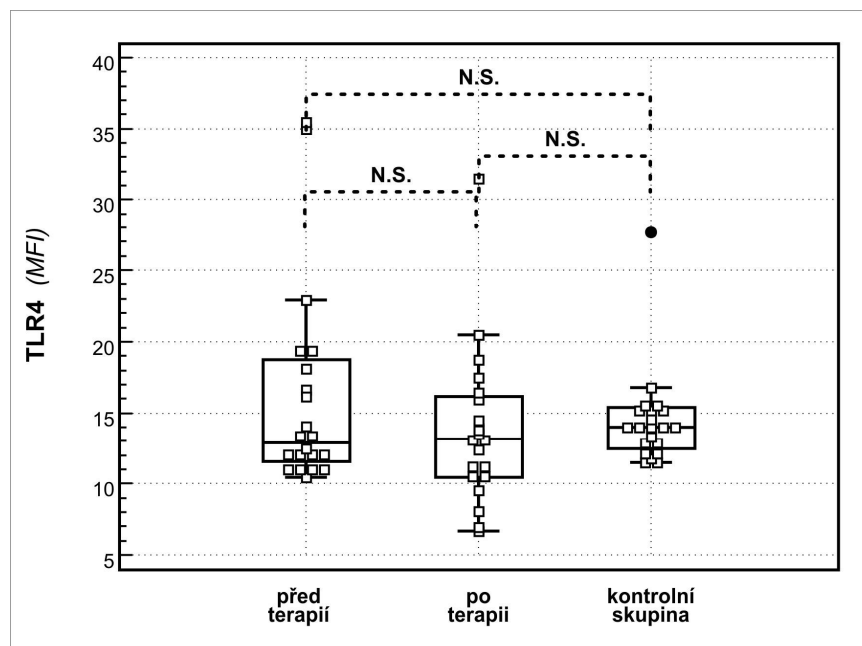
#### 4.6. Stanovení exprese povrchové formy TLR4 na monocytech u pacientů s psoriázou léčených Goeckermanovou terapií

Expresí membránové molekuly TLR4 na monocytech byla stanovena u 20 dospělých pacientů s psoriázou. Všichni měli pozitivní odezvu na léčbu. Hodnoty PASI skóre poklesly z počáteční hodnoty  $18,6 \pm 7,2$  na  $8,0 \pm 3,7$  po terapii ( $P < 0,0001$ ). Nebyly prokázány žádné statisticky významné korelace mezi expresí TLR4 a aktivitou nemoci vyjádřenou jako PASI skóre.

V porovnání s kontrolní skupinou ( $14,0$  ( $12,6 - 15,4$ )) jsme nenalezli žádné statistické rozdíly mezi expresí TLR4, vyjádřenou jako MFI, u pacientů s psoriázou jak před ( $12,9$  ( $11,6 - 18,7$ );  $P = 0,6168$ ) tak po ( $13,2$  ( $10,5 - 16,2$ );  $P = 0,6333$ ) Goeckermanově terapii.

Expresí membránové formy TLR4 na monocytech nebyla ovlivněna Goeckermanovou terapií ( $P = 0,2$ ).

Výsledky týkající se membránové exprese TLR4 jsou shrnuty v grafu č. 21.



**Graf č. 21:** Membránová exprese TLR4 na monocyttech u pacientů s psoriázou před a po GT a kontrolní skupiny.

## 5. Diskuze

Jak zdravá tak psoriatická kůže představuje dynamickou, periferně situovanou bariéru zejména proti chemickému, mechanickému, fyzikálnímu, světelnému a radiačnímu poškození. Její další významnou funkcí je obrana proti pronikání mikroorganismů (26). Psoriáza je jedna z nejčastějších kožních nemocí s často celoživotně recidivujícím průběhem. Je to chronické onemocnění, které výrazně zhoršuje kvalitu života. Subjektivní potíže jako je svědění, pálení nebo bolesti kloubů mohou ovlivnit i běžné každodenní činnosti (120). Léčba psoriázy je komplikovaná a vyžaduje individuální, odborný a citlivý přístup lékaře. Goeckermanova terapie patří v České republice mezi stále velmi často používané léčebné postupy. Tato terapie je založená na denní aplikaci farmaceutického uhelného dehtu na zasaženou pokožku s následnou expozicí těla kontrolovanému množství UV záření. GT kombinuje protizánětlivé a imunomodulační efekty alifatických a aromatických uhlovodíků a imunosupresivní a imunomodulační aktivity UV záření. GT je vysoce účinná v dosažení remise (29).

Existují určité bezpečnostní obavy ohledně Goeckermanovy terapie. Je zde riziko kontaminace dehtu chemickými složkami s mutagenní aktivitou (29). Za rizikovost kamenouhelného dehtu jsou zodpovědné především polycyklické aromatické uhlovodíky (PAU) (18, 38). PAU vznikají při nedokonalém spalování organické hmoty a řada z nich působí mutagenně a karcinogenně. Mnohé PAU, např. benzo(a)pyrene, potlačují jak humorální tak buňkami zprostředkovanou imunitu. Buněčné a biochemické mechanismy, kterými PAU způsobují imunosupresi nejsou úplně známy. Ultrafialové záření používané při Goeckermanově terapii pravděpodobně zvyšuje riziko mutagenity, karcinogenity a imunotoxicity (19, 20, 124, 125, 126).

Vzhledem k výše popsaným nežádoucím účinkům se řada vědců pokusila stanovit celkové karcinogenní riziko Goeckermanovy terapie. Výsledky jsou však rozdílné. Některé studie sice uvádí zvýšené riziko rakoviny u pacientů léčených kamenouhelným dehtem (s nebo bez expozice UV záření) (97, 138), avšak další studie toto riziko nepotvrdily (17, 20, 38, 61, 116, 123).

Tato práce byla zaměřená na sledování změn různých buněčných populací a imunologických markerů v průběhu Goeckermanovy terapie. Také jsme porovnávali míru exprese těchto markerů u pacientů s psoriázou a u zdravých kontrol. Zaměřili jsme se na

stanovení T regulačních lymfocytů, expresi membránové formy vychytávacího receptoru CD163, Toll-like receptoru 2 a 4 a hladiny solubilní sCD163 a solubilní sTLR2.

Deficitní **Treg** lymfocyty byly nalezeny v řadě autoimunitních stavů, včetně roztroušené sklerózy, revmatoidní artritidy a psoriázy. Chen a spol. zdůraznili, že pro efektivní imunitní odpověď je velmi důležitá rovnováha mezi aktivovanými efektorovými buňkami a Treg lymfocyty (71). Nedávno řada vědců popsala nerovnováhu mezi Treg a efektorovými T lymfocyty u pacientů s psoriázou. Jejich zjištění naznačují, že počet a/nebo funkce Treg lymfocytů u pacientů s psoriázou může být narušena a to následně vede ke zvýšené proliferaci patogenních T lymfocytů (71, 140, 161, 169). Bovenschen a spol. zjistili, že v biopsii kůže zdravých lidí se Treg lymfocyty nenacházejí, zatímco u pacientů s psoriázou byly nalezeny jak v dermis tak v menším množství i v epidermis. Ve své práci naznačili, že Treg lymfocyty jak v dermis tak epidermis nejsou schopné vykonávat své supresorové funkce (21). Goodman a spol. vyslovili hypotézu, že vysoké hladiny IL-6 v postižené psoriatické tkáni mohou tlumit supresorové funkce Treg a že tento prozánětlivý cytokin umožňuje efektorovým buňkám unikat před Treg supresí, což přispívá ke zvýšeným počtům efektorových buněk v psoriatických placích. Tento cytokin je u pacientů s psoriázou v lézích výrazně zvýšený a je produkován zejména endoteliálními buňkami, dendritickými buňkami a Th17. IL-6 stimuluje keratinocyty, podporuje diferenciaci T lymfocytů produkujících IL-17 a zároveň snižuje Treg diferenciaci (55).

Goeckermanova terapie je vysoce účinná v navozování remise, což se měří pomocí poklesu PASI skóre (29). I přes dlouholetou historii Goeckermanovy terapie nejsou její imunomodulační mechanismy detailně známy. Největší nevýhoda této terapie je nedostatek znalostí o složení kamenouhelného dehtu. Dehet se skládá z převážně neurčitých alifatických a aromatických uhlovodíků, které jsou v kombinaci s imunomodulačním efektem UV záření odpovědné za snížení nadměrné proliferace epidermálních buněk (54, 89). GT projevuje imunomodulační, imunosupresivní a protizánětlivý efekt. Bylo prokázáno, že propojení terapie kamenouhelným dehtem a UV zářením je mnohem účinnější než každá léčba zvlášť (81). Kamenouhelný dehet působí protizánětlivě, antibakteriálně a proti svědění. Také má fotodynamický efekt, díky kterému je kůže více citlivá na působení UV světla (123). UV potlačuje lokální i systémovou zánětlivou odpověď. Indukuje T lymfocytární supresorovou aktivitu, tlumí funkci antigen prezentujících buněk a povzbuzuje vylučování imunosupresivních cytokinů (20). Maeda a spol. a Schwarz a spol. zjistili, že UV záření vede k indukci Treg lymfocytů (UV-Treg). Tyto UV-Treg mají na svém povrchu molekuly CD4, CD25, CTLA-4, GITR a neurophilin-1 a produkují cytokin IL-10. Protože mají schopnost

potlačovat imunitní odpovědi prostřednictvím antigen specifické reakce, představují terapeutický potenciál stejně jako ostatní typy Treg lymfocytů (94, 135).

V souladu s dalšími studiemi (71, 127, 132, 140, 169) jsme zjistili, že počty Treg lymfocytů v periferní krvi pacientů s psoriázou jsou srovnatelné s počty těchto buněk u zdravých kontrol. Chen a spol. stejně tak jako Zhang a spol. uvedli, že nezjistili žádné významné rozdíly v počtech Treg lymfocytů mezi pacienty s psoriázou a kontrolní skupinou (71, 169). Saito a spol. informovali, že procento  $CD4^+CD25^+FoxP3^+$  Treg lymfocytů v periferní krvi pacientů s psoriázou před bath-PUVA terapií je nepatrně nižší než u zdravých dobrovolníků, ale tento rozdíl nebyl statisticky významný (127). V souladu s našimi výsledky bylo procento Treg lymfocytů u psoriatických pacientů po bath-PUVA terapii významně vyšší. Furuhashi a spol. uvedli, že léčba pomocí monochromatického záření 308nm (Excimer laser) vede ke zvýšení počtu T regulačních lymfocytů (44). Quaglino a spol. zjistili, že biologická léčba (etanercept, infliximab, efalizumab) také vyvolává zvýšení počtů Treg lymfocytů a dosažení dobré klinické odpovědi (117). Sugiyama a spol. zjistili, že Treg lymfocyty u pacientů s psoriázou projevují oslabenou supresorovou aktivitu, zároveň ale nedochází ke snížení jejich počtu v periferní krvi. Navrhli, že toto funkční oslabení Treg lymfocytů u pacientů s psoriázou může vést k selhání regulace autoreaktivních T lymfocytů s následným nárůstem jejich počtu (48, 140).

Tato studie, ve které jsme dokázali, že po Goeckermanově terapii dochází ke zvýšení počtu Treg lymfocytů v periferní krvi pacientů s psoriázou, přispívá k dalšímu objasnění imunomodulačních efektů Goeckermanovy terapie.

**CD163** je nový specifický monocyto/makrofágový biomarker spojený s různými klinickými stavy, jako jsou ateroskleróza, srdeční choroby, transplantace, rakovina, infekce a autoimunita (3, 36, 43, 46, 52). Zvláštní pozornost je věnována molekule CD163 u pacientů, kteří jsou vystaveni velkému množství volných hem/hemoproteinů následkem intravaskulární hemolýzy a tkáňového poškození, například při kardiochirurgické operaci s kardiopulmonárním bypasem (CPB) (80). Exprese CD163 je zvýšená během pozdní fáze akutního zánětu i u chronického zánětu (42, 133). CD163 molekula by mohla sloužit jako prognostický marker u vybraných zánětlivých chorob (110, 171). Na rozdíl od jiných zánětlivých markerů je CD163 receptor vyjádřen výhradně na monocitech/makrofázích.

Efekt Goeckermanovy terapie na expresi CD163 ještě nebyl vyšetřován. V tomto ohledu se naše studie zdá být originální. Naše výsledky prokázaly, že hladiny jak membránové exprese CD163 na monocitech tak solubilní sCD163 v séru jsou u pacientů s psoriázou před GT významně vyšší v porovnání se zdravými kontrolami. Tento nárůst

CD163 receptoru svědčí o probíhajícím zánětlivém procesu u pacientů s psoriázou. V souladu s našimi výsledky, Zaba a spol. ve svém článku uvedli, že CD163 pozitivní buňky projevily trojnásobné zvýšení v lézích psoriatické kůže a po efektivní léčbě etanerceptem se vrátily na hladiny odpovídající počtům v kůži bez lézí (168). Fuentes-Duculan a spol. došli k závěru, že makrofágy u psoriázy pravděpodobně přispívají k rozvoji patogenního zánětu uvolňováním klíčových zánětlivých produktů (43).

Zjistili jsme, že sérové hladiny sCD163, které jsou u pacientů s psoriázou před terapií zvýšené, významně klesají po terapii. Na druhou stranu jsme nenaměřili žádné rozdíly v expresi membránového CD163 receptoru na monocytech před a po terapii. V porovnání s kontrolní skupinou je monocytární exprese membránové CD163 u pacientů s psoriázou významně vyšší a nedochází pomocí GT k podstatnému ovlivnění. Toto zjištění může být vysvětleno tím, že je přítomnost protizánětlivých makrofágů v kůži výhodná. Proto zůstává membránová exprese CD163 zvýšená i po terapii a prodlužuje její protizánětlivé působení i po ukončení GT. Naopak, hladiny sCD163 v cirkulaci byly po terapii sniženy, protože GT snižuje aktivitu metaloproteináz, které jsou odpovědné za odštěpování CD163 z membránových povrchů (65).

Solubilní molekula sCD163 v periferní krvi je nyní považována za nový biomarker zánětu, zatímco membránová exprese CD163 na monocytech je spojena s protizánětlivým fenoménem (80).

Na závěr lze říct, že exprese jak membránově vázané CD163 tak solubilní sCD163 odráží probíhající zánětlivý proces u pacientů s psoriázou a je výrazně vyšší než u kontrolní skupiny. GT u pacientů s psoriázou značně snižuje sérové hladiny sCD163.

Rozpoznání nebezpečných vzorů, mechanismus, který je velmi důležitý pro rozvoj zánětlivé odpovědi, je uskutečňováno prostřednictvím PRR receptorů (Pattern Recognition Receptor). Toll-like receptory mají mezi těmito PRR zásadní roli. TLR mohou zasahovat do patogeneze řady zánětlivých chorob, včetně chorob kůže jako je psoriáza. Proto jsme se zaměřili na stanovení jak membránové tak solubilní formy vybraných Toll-like receptorů u pacientů s psoriázou.

Některé studie prokázaly podstatně vyšší expresi **TLR2** na monocytech/makrofázích u pacientů se zánětlivým onemocněním v porovnání se zdravými kontrolami (63, 73). Iwahashi a spol. naměřili u pacientů s revmatoidní artritidou větší intenzitu fluorescence TLR2 na monocytech než u zdravých kontrol (73). Hausmann a spol. se zaměřili na imunohistochemické stanovení TLR2 exprese na podslizničních buňkách ve střevní sliznici,

kde probíhá zánět. Imunohistochemicky prokázali zvýšenou expresi TLR2 na buňkách lamina propria u pacientů se zánětem střevní sliznice (63).

Baker a spol. ve své práci uvedli, že epidermální keratinocyty ve zdravé kůži exprimují TLR1, TLR2 a TLR5. Je známo, že propuknutí nebo zhoršení psoriatických lézí může být způsobeno streptokokovou infekcí. Proto Baker a spol. naznačili, že určité mikroorganismy mohou spouštět nebo zhoršovat tuto kožní chorobu aktivací TLR na keratinocytech. Dále zjistili, že distribuce TLR2 je u pacientů s psoriázou odlišná než u zdravých jedinců. U zdravé kůže je nejvyšší exprese TLR2 na bazálních keratinocytech. Naopak, u pacientů s psoriázou je exprese TLR2 vyšší na keratinocytech ve vyšších vrstvách epidermis. Tato zvýšená exprese TLR2 ve vyšších vrstvách epidermis v psoriatických lézích může být způsobena odpovědí na přítomnost grampozitivních bakterií. Dalším vysvětlením je vliv prozánětlivých cytokinů (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ) na zvýšenou expresi TLR2. Tato odlišná exprese TLR2 může být také vyvolaná zvýšenou proliferací a/nebo narušenou maturací keratinocytů (6). Baker a spol. také uvedli, že přítomnost TLR1, TLR2 a TLR5 ve zdravé epidermis je pravděpodobně důležitá k ochraně proti bakteriím a plísním (6, 25).

Begon a spol. ve své práci uvedli, že keratinocyty exprimují všechny TLR receptory a že cytokiny TNF- $\alpha$  a IFN- $\gamma$  zvyšují cytoplazmatickou i povrchovou expresi většiny TLR, včetně TLR2, 3 a 4. Také potvrdili, že TLR2, 3 a 4 jsou funkční ligandy keratinocytů. Stimulace keratinocytů mikrobiálními ligandy vede k translokaci NF $\kappa$ B a zvýšené expresi prozánětlivých cytokinů. V jejich studii uvedli, že je TLR2 exprese zvýšená v psoriatických lézích a naznačili, že TLR receptory mohou hrát významnou roli v patogenezi řady zánětlivých chorob, včetně psoriázy. TLR receptory mohou podporovat chronický zánět v psoriatické kůži uvolňováním prozánětlivých cytokinů. Psoriáza je kožní onemocnění s převahou Th1 odpovědi, pro které je typická produkce cytokinů TNF- $\alpha$  a IFN- $\gamma$ . Tyto cytokiny jsou uvolňovány mimo jiné i keratinocyty po jejich stimulaci prostřednictvím TLR infekčních ligandů. TNF- $\alpha$  a IFN- $\gamma$  cytokiny zvyšují expresi TLR2 receptoru (9).

LeBouder a spol. naznačili, že hlavním zdrojem solubilní formy sTLR2 v plazmě mohou být monocyty a že sTLR2 vzniká přeměnou povrchové TLR2. Kromě monocytů mohou sTLR2 uvolňovat také neutrofilů, které také exprimují TLR2, i když v menším množství než monocyty. Le Bouder a spol. ve své studii také prokázali, že buněčná aktivace vede ke snížení povrchové formy TLR2 a naopak k rychlému uvolňování sTLR2 (88). Raby a spol. demonstrovali, že sTLR2 reguluje buněčné odpovědi zprostředkované TLR2. Regulace prostřednictvím sTLR2 je důležitý fyziologický mechanismus přirozené imunity (118).



Naše výsledky prokazují, že membránová exprese TLR2 na monocytech je ve srovnání s kontrolní skupinou u pacientů s psoriázou výrazně vyšší jak před tak po ukončení GT. Hausmann a spol. a Iwahashi a spol. ve svých pracích dokázali zvýšenou expresi TLR2 na monocytech či makrofázích u pacientů s různými zánětlivými chorobami (63, 73). Naše práce podporuje tato tvrzení, protože jsme zjistili vyšší hodnoty TLR2 na monocytech u pacientů s psoriázou, která je považována za zánětlivé onemocnění. Hladina solubilní sTLR2 byla v porovnání s kontrolní skupinou naopak signifikantně nižší u pacientů s psoriázou jak před tak i po GT.

Zvýšená exprese TLR2 na monocytech v periferní krvi pacientů s psoriázou může být způsobena prozánětlivým prostředím typickým pro tuto chorobu. Cytokiny TNF- $\alpha$  a IFN- $\gamma$  zvyšují expresi většiny TLR, včetně TLR2. Dalším vysvětlením může být přítomnost signálů nebezpečí. Zvýšená exprese TLR2 vede k další prozánětlivé signalizaci. U nemocných s psoriázou je snížen protizánětlivý efekt sTLR2, což pravděpodobně také přispívá ke zvýšené expresi TLR2 na monocytech.

Přestože Goeckermanova terapie působí protizánětlivě, není schopná terapeuticky zasáhnout do exprese membránové TLR2 a solubilní sTLR2. GT je vysoce účinná v léčbě psoriázy a dosahuje dobré klinické odpovědi u většiny pacientů. V naší práci jsme prokázali, že některé parametry imunity jsou ovlivněny touto terapií, např. že GT je schopná snížit hladiny sCD163 a naopak zvýšit počty Treg lymfocytů. Neschopnost zvýšit hladiny sTLR2 a naopak snížit expresi membránové formy TLR2 na monocytech v průběhu GT může být způsobena možným přetrváváním bakteriálních PAMP i po úspěšné léčbě pomocí Goeckermanovy terapie. Tento fakt může být jedním z důvodů relapsu psoriázy. Exprese TLR2 na monocytech a hladina sTLR2 v séru odráží probíhající zánět u pacientů s psoriázou.

Zvýšená exprese TLR2 naznačuje zapojení těchto receptorů přirozené imunity do patogeneze kožních zánětů. U psoriázy je pravděpodobně nedostatečná regulace aktivace TLR receptorů a to vede k přehnané odpovědi přirozené imunity.

Nenašli jsme žádné statisticky významné rozdíly v **TLR4** expresi mezi pacienty s psoriázou a kontrolní skupinou. Mita a spol. ve své studii uvedli, že IL-2 a IFN- $\gamma$  zvyšují TLR4 expresi na monocytech, zatímco přítomnost cytokinu IL-4 vede ke snížení TLR4 receptoru na monocytech. Naznačili, že Th1 cytokinová odpověď zesiluje působení Toll-like receptorů na gramnegativní bakterie (98). Přestože je psoriáza považována za chorobu s převahou Th1 cytokinové odpovědi, nezjistili jsme u našich pacientů vyšší expresi TLR4 na monocytech v porovnání s kontrolní skupinou. Hausmann a spol. imunohistochemickým barvením prokázali vyšší expresi TLR4 na makrofázích ve střevní sliznici, kde probíhá zánět

(63). Seung a spol. ve shodě s našimi výsledky nenalezli žádné rozdíly mezi expresí TLR4 u pacientů s psoriázou a zdravými kontrolami (76, 131).

Vzhledem k naší výsledkům lze předpokládat, že TLR2 a TLR4 hrají v patogenezi psoriázy odlišné role.

## 6. Souhrn

### Úvod:

Psoriáza je systémová zánětlivá choroba s manifestací na kůži. Postihuje přibližně 2% populace. Je to choroba charakterizována hyperproliferací a abnormální diferenciací keratinocytů a v kožních lézích dochází k hromadění aktivovaných T lymfocytů a granulocytů.

Goeckermanova terapie (GT) představuje klasický přístup léčby psoriázy a je založena na denní aplikaci farmaceutického uhelného dehtu na zasaženou pokožku s následnou expozicí UV světla. GT dosahuje dobrých klinických výsledků s dlouhodobou remisí u většiny pacientů. Tato terapie je, bez ohledu na dlouho diskutovanou potenciální genotoxicitu, stále preferována kvůli snadné aplikaci, dobré klinické odpovědi a nízké ceně.

Cílem této práce bylo sledovat vybrané imunologické markery a populace buněk u pacientů s psoriázou a zkoumat vliv GT na tyto parametry. Hodnotili jsme počty T regulačních lymfocytů (Treg), membránovou expresi vychytávacího receptoru CD163 na monocitech, hladiny solubilní CD163 (sCD163), membránovou expresi TLR2 a TLR4 na monocitech a solubilní TLR2 v séru (sTLR2).

### Metody:

Tato práce vznikla za podpory grantů MZCR č. 00179906, MŠMT č. MSM0021620812, SVV-2011-262902 a programu PRVOUK P37/09. Studie byla schválena etickou komisí Fakultní nemocnice Hradec Králové. Informovaný souhlas byl podepsán každým pacientem a dárce krve. Vzorky venózní krve byly odebrány před léčbou a po dokončení Goeckermanovy terapie. Krev byla také odebrána od zdravých dárců krve, kteří sloužili jako kontrolní skupina. Imunofluorescenční analýza byla provedena na zlyzované periferní krvi pomocí průtokového cytometru FC500 Cytomics (Beckman Coulter) and FACSCalibur (Becton Dickinson). Hladina solubilních markerů byla stanovena pomocí ELISA kitů.

### Výsledky:

**Treg lymfocyty:** Cílem bylo porovnat počty Treg lymfocytů v periferní krvi psoriatických pacientů a kontrol a stanovit vliv GT na Treg lymfocytární populaci v periferní krvi pacientů s psoriázou. Nenašli jsme žádné významné rozdíly v relativních počtech Treg

lymfocytů v periferní krvi kontrolní skupiny ( $2,9 \pm 1,0$  %) a pacientů s psoriázou před ( $3,3 \pm 1,2$  %) zahájením léčby GT ( $P = 0,2668$ ). Relativní počet Treg lymfocytů u pacientů s psoriázou byl po GT ( $4,3 \pm 1,6$  %) signifikantně vyšší než u kontrolní skupiny ( $P = 0,0019$ ). Po GT došlo k výraznému vzestupu v relativním počtu Treg lymfocytů ( $P = 0,0042$ ).

**CD163 a sCD163:** Hodnotili jsme kinetiku exprese CD163 na monocytech a koncentraci solubilní sCD163 v séru pacientů s psoriázou a zjišťovali jsme efekt GT na (s)CD163. V porovnání se sérovými hladinami u kontrolní skupiny (1128,0 ng/ml (887,8 - 1325,0)) byly sérové hladiny sCD163 u pacientů s psoriázou před GT (1363,0 ng/ml (852,5 - 1778,5)) signifikantně vyšší ( $P = 0,0154$ ). sCD163 byla u pacientů po terapii výrazně snížena. Hladiny sCD163 klesly z 1363,0 ng/ml (852,5 - 1778,5) před terapií na 1182,0 ng/ml (850,0 - 1610,3) po ukončení léčby. Membránová exprese CD163 na monocytech byla v porovnání se zdravými kontrolami ( $64,5 \pm 28,6$ ) u pacientů s psoriázou vyšší jak před ( $88,9 \pm 38,2$ ,  $P = 0,0078$ ) tak po GT ( $88,1 \pm 28,5$ ,  $P = 0,0019$ ). Exprese CD163 u pacientů nebyla významně ovlivněna Goeckermanovou terapií ( $P = 0,8666$ ).

**TLR2 a sTLR2:** V porovnání se sérovými hladinami u zdravých kontrol ( $8,8 \pm 4,8$  ng/ml) byly sérové hladiny sTLR2 u pacientů s psoriázou významně nižší ( $P < 0,0001$ ) jak před ( $2,2 \pm 1,8$  ng/ml) tak po GT ( $2,1 \pm 1,8$  ng/ml). GT neovlivnila sérové hladiny sTLR2 ( $P = 0,7322$ ). Membránová exprese TLR2 na monocytech byla v porovnání se zdravými dárči krve (26,5 (23,4 - 30,6)) u pacientů s psoriázou vyšší jak před (55,8 (35,5 - 81,6),  $P = 0,0003$ ) tak po GT (58,6 (37,2 - 81,5),  $P = 0,0001$ ). GT neovlivnila ani membránovou expresi TLR2 na monocytech ( $P = 0,9836$ ).

**TLR4:** V porovnání s kontrolní skupinou (14,0 (12,6 - 15,4)) jsme nenalezli žádné statistické rozdíly mezi expresí TLR4 u pacientů s psoriázou jak před (12,9 (11,6 - 18,7);  $P = 0,6168$ ) tak po (13,2 (10,5 - 16,2);  $P = 0,6333$ ) Goeckermanově terapii. Exprese membránové formy TLR4 na monocytech nebyla ovlivněna Goeckermanovou terapií ( $P = 0,2$ ).

### **Závěr:**

V porovnání se zdravou kontrolní skupinou jsme zaznamenali výrazné změny ve většině sledovaných imunologických markerů u pacientů s psoriázou. Goeckermanova terapie měla vliv na některé vyšetřované parametry imunity. Zvýšený počet Treg lymfocytů po GT je pravděpodobně spojen se zlepšením zánětlivého stavu u pacientů s psoriázou po léčbě. Hladina solubilní sCD163 po GT klesla, zatímco exprese membránové formy CD163 na monocytech se po GT výrazně nezměnila. Během terapie také nedošlo k ovlivnění jak povrchové TLR2 a TLR4, tak solubilní formy sTLR2. S ohledem na naše výsledky

předpokládáme, že Treg lymfocyty, (s)CD163 a Toll-like receptory mohou přispívat do patogeneze psoriázy. Sledování různých imunologických parametrů je důležité k lepšímu pochopení imunomodulačních efektů Goeckermanovy terapie.

## 6. Summary

### **Background:**

Psoriasis is a systemic inflammatory disorder with skin manifestation. It affects approximately 2% of the world population. This disease is characterized by hyperproliferation and abnormal differentiation of keratinocytes with activated T cells and granulocytes accumulated in involved skin areas.

Classical approach to treat psoriasis is Goeckerman therapy (GT) which is based on daily application of pharmaceutical coal tar on affected skin with subsequent exposition to UV light. GT achieves good clinical response followed by a long-term remission in a majority of patients. This therapy is still preferred for its simple application, good clinical response, and low cost regardless a long term debate addressing its potential genotoxicity.

The aim of this study was to observe selected immunological markers and cell subpopulations in patients with psoriasis and to elucidate the effect of GT on these parameters. We evaluated T regulatory cells (Treg), membrane CD163 expression on monocytes, serum levels of CD163 (sCD163), membrane TLR2 and TLR4 expression on monocytes and serum levels of TLR2 (sTLR2).

### **Methods:**

This study was supported by grants MZCR No. 00179906, MŠMT No. MSM0021620812, SVV-2011-262902 and by the programme PRVOUK P37/09. The study was approved by the Ethics Committee of the University Hospital in Hradec Kralove. Informed written consent was obtained from each patient and blood donor. Samples of venous blood were obtained before treatment and again after completion of Goeckerman therapy. Venous blood was also collected from the otherwise healthy blood donors who served as control. The immunofluorescent analysis was performed on erythrocyte lysed peripheral blood using a flow cytometer FC500 Cytomics (Beckman Coulter) and FACSCalibur (Becton Dickinson). The level of soluble markers was detected by sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

## Results:

**Treg cells:** The aim was to compare the number of Treg in the peripheral blood of psoriatic patients and controls and to evaluate the influence of GT on Treg population in peripheral blood of patients with psoriasis. There was no significant difference in the relative number of Treg cells in the peripheral blood of healthy blood donors ( $2.9 \pm 1.6 \%$ ) and patients with psoriasis before ( $3.3 \pm 1.2 \%$ ) initiation of GT ( $P = 0.2668$ ). In contrary, the relative number of Treg cells in peripheral blood of patients with psoriasis after GT ( $4.3 \pm 1.6 \%$ ) was significantly higher than those found in healthy blood donors ( $P = 0.0019$ ). Moreover, the relative number of Treg is significantly increased in psoriatic patients after Goeckerman therapy compared to the pre-treatment level ( $P = 0.0042$ ).

**CD163 and sCD163:** We assess both the kinetics in the expression of CD163 on peripheral blood cells and the concentration of soluble sCD163 in serum of psoriatic patients and to examine the effect of GT on (s)CD163 expression. In comparison with serum level in controls (1128.0 ng/ml (887.8 - 1325.0)), the level of sCD163 in patients with psoriasis before GT (1363.0 ng/ml (852.5 - 1778.5)) was significantly higher ( $P = 0.0154$ ). sCD163 in patients was significantly diminished after therapy ( $P = 0.0037$ ). The serum level of sCD163 significantly fell from 1363.0 ng/ml (852.5 - 1778.5) before therapy to 1182.0 ng/ml (850.0 - 1610.3) after therapy. Compared to membrane expression CD163 on monocytes, expressed as mean fluorescence index (MFI), in healthy blood donors ( $64.5 \pm 28.6$ ), membrane CD163 expression was significantly higher in patients with psoriasis both before GT ( $88.9 \pm 38.2$ ,  $P = 0.0078$ ) and after GT ( $88.1 \pm 28.5$ ,  $P = 0.0019$ ) being only nonsignificantly changed when compared expression before and after GT ( $P = 0.8666$ ).

**TLR2 and sTLR2:** In comparison with serum level in healthy controls ( $8.8 \pm 4.8$  ng/ml), serum level of sTLR2 in patients with psoriasis was significantly lower ( $P < 0.0001$ ) both before ( $2.2 \pm 1.8$  ng/ml) and after GT ( $2.1 \pm 1.8$  ng/ml). Serum level of sTLR2 was not significantly affected by Goeckerman therapy ( $P = 0.7322$ ). In comparison with the intensity of membrane TLR2 expression on monocytes, expressed as mean fluorescence index (MFI), which was in healthy blood donors 26.5 (23.4 - 30.6), intensity of membrane TLR2 expression in patients with psoriasis was significantly higher both before GT (55.8 (35.5 - 81.6),  $P = 0.0003$ ) and after GT (58.6 (37.2 - 81.5),  $P = 0.0001$ ). Moreover, the expression of monocyte membrane TLR2 was not significantly affected by GT ( $P = 0.9836$ ).

**TLR4:** Compared to membrane expression TLR4 on monocytes, expressed as mean fluorescence index (MFI), in healthy blood donors (14.0 (12.6 - 15.4)), we found no significant differences in this expression in patients with psoriasis both before (12.9 (11.6 -

18.7);  $P = 0.6168$ ) and after GT (13.2 (10.5 - 16.2);  $P = 0.6333$ ). The expression of monocyte membrane TLR4 was not significantly affected by GT ( $P = 0.2$ ).

### **Conclusions:**

In comparison with control group, we found the significant differences in the most determined immunological markers in patients with psoriasis. We found that select immunological parameters are affected by GT. The significant increase in Treg count after GT is probably associated with amelioration of inflammation by GT. Whereas sCD163 level in psoriatic patients was diminished after GT therapy, monocyte membrane CD163 expression remained unchanged. Both monocyte membrane TLR2 and TLR4 and soluble sTLR2 expression remained unchanged after GT. With regard to our results we propose that the number and/or function of Treg cells, (s)CD163 and Toll-like receptors may be involved in the pathogenesis of psoriasis. Investigation of different immunological markers adds a substantial supplementary piece to the list of GT immunomodulatory effects.



## 7. Závěr

Cílem této disertační práce bylo zhodnotit vybrané parametry imunitního systému u pacientů s psoriázou a jejich dynamiku v souvislosti s Goeckermanovou terapií.

Soubor nemocných zahrnoval dospělé pacienty s diagnózou psoriázy, u kterých byla na Klinice nemocí kožních a pohlavních Fakultní nemocnice Hradec Králové indikována Goeckermanova terapie. Závažnost onemocnění a zároveň účinnost léčby byla hodnocena pomocí PASI skóre. Vzorky krve byly od pacientů odebrány před začátkem Goeckermanovy terapie a v den propuštění z nemocniční péče. Zároveň byly odebrány vzorky krve i od zdravých dárců krve na Tranfuzním oddělení Fakultní nemocnice Hradec Králové, kteří sloužili jako kontrolní skupina. Skupiny pacientů a kontrol se statisticky nelišily věkem, ani zastoupením jednotlivých pohlaví.

Byly vybrány následující parametry imunitního systému: T regulační lymfocyty (Treg), membránově vázaný vychytávací receptor CD163 na monocitech v periferní krvi, solubilní CD163 (sCD163) v séru, membránová forma Toll-like receptoru 2 (TLR2) a 4 (TLR4) a solubilní forma TLR2 (sTLR2). Hodnocení parametrů buněčné imunity bylo provedeno na průtokovém cytometru FACS Calibur (Becton Dickinson) a FC500 Cytomics (Beckman Coulter). Sérové hladiny sCD163 a sTLR2 byly stanoveny komerčně dostupnými ELISA kity.

Počty T regulačních lymfocytů se u pacientů s psoriázou před zahájením terapie a u zdravých kontrol významně nelišily. Podařilo se nám prokázat zvýšení počtu Treg lymfocytů po ukončení Goeckermanovy terapie. Na základě našich výsledků lze konstatovat, že počet Treg lymfocytů není u pacientů s psoriázou odlišný v porovnání s kontrolní skupinou, ale pro dostatečné regulační funkce Treg lymfocytů jsou u těchto pacientů potřebné vyšší počty. GT pozitivně působí na zvyšování počtu této regulační populace T lymfocytů.

Stanovovali jsme efekt GT na expresi vychytávacího receptoru CD163 na monocitech. Na rozdíl od jiných zánětlivých markerů je CD163 receptor vyjádřen výhradně na monocitech/makrofázích. Membránová exprese CD163 na monocitech je v porovnání se zdravými kontrolami u pacientů s psoriázou před GT významně vyšší. Tato vysoká exprese CD163 receptoru svědčí o probíhajícím zánětlivém procesu u těchto pacientů. Exprese membránové CD163 na monocitech není významně ovlivněna GT.

Sérové hladiny sCD163, které jsou u pacientů s psoriázou před terapií v porovnání s kontrolní skupinou zvýšené, významně klesají po terapii. Pokles solubilní molekuly sCD163 svědčí o snížení zánětlivého procesu po GT, která působí protizánětlivě a imunomodulačně.

TLR mohou zasahovat do patogeneze řady zánětlivých chorob, včetně psoriázy. Membránová exprese TLR2 na monocytech je ve srovnání s kontrolní skupinou u pacientů s psoriázou výrazně vyšší jak před tak po ukončení GT. Hladina solubilní sTLR2 je naopak oproti kontrolám snižena. GT není schopná terapeuticky zasáhnout do exprese membránové TLR2 a solubilní sTLR2. Nenašli jsme žádné statisticky významné rozdíly v TLR4 expresi mezi pacienty s psoriázou a kontrolní skupinou. GT nijak neovlivnila expresi TLR4.

Znalost kvalitativních i kvantitativních změn různých parametrů imunity u psoriázy a jejich ovlivnění terapií, např. Goeckermanovou, by mohla vést k identifikaci specifických markerů pro monitorování progresu a chorobné aktivity psoriázy. Z naší studie vyplývá, že Goeckermanova terapie má pozitivní vliv na počty Treg lymfocytů a snižuje hladiny sCD163 molekuly, která je považována za nový biomarker zánětu. Zvýšená exprese TLR2 a naopak snížená hladina sTLR2 svědčí o stále probíhajícím zánětu u pacientů s psoriázou i po vymizení klinických příznaků po GT. Proto lze konstatovat, že Toll-like receptory mají pravděpodobně určitý podíl na patogenezi psoriázy.

Přes účinnost léčby zůstává psoriáza stále nevyléčitelnou nemocí. Goeckermanova terapie je schopná navodit dlouhodobou remisi u většiny pacientů. Přesto imunitní systém i kůže psoriatiků vykazuje abnormality i v období bez klinických příznaků.

## 8. Literatura

1. Andrys, C., Borska, L., Pohl, D., Fiala, Z., Hamakova, K., Krejsek, J. Angiogenic activity in patients with psoriasis is significantly decreased by Goeckerman's therapy. *Arch Dermatol Res*, 2007, vol. 298, no. 10, s. 479–483.
2. Arenberger, P. Psoriasis vulgaris – projevy a současné možnosti léčby. *Lékařské listy*, 2006, vol. 11. s. 4–10, ISSN 0044-1996.
3. Aristoteli, L.P., Möller, H.J., Bailey, B., Moestrup, S.K., Kritharides, L. The monocytic lineage specific soluble CD163 is a plasma marker of coronary atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 2006, vol. 184, s. 342–347.
4. Bachelez, H. Immunopathogenesis of psoriasis: recent insights on the role of adaptive and innate immunity. *J Autoimmun*, 2005, vol. 25, s. 69–73.
5. Baker, B.S., Bokth, S., Powles, A., Garioch, J.J., Lewis, H., Valdimarsson, H., Fry, L. Group A streptococcal antigenspecific T lymphocytes in guttate psoriatic lesions. *Br J Dermatol*, 1993, vol. 128, no. 5, s. 493–499.
6. Baker, B.S., Ovigne, J-M., Powles, A.V., Corcoran, S., Fry, L. Normal keratinocytes express Toll-like receptors (TLRs) 1, 2 and 5: modulation of TLR expression in chronic plaque psoriasis. *Br J Dermatol*, 2003, vol. 148, no. 4, s. 670-679.
7. Battaglia, M., Gregori, S., Bacchetta, R., Roncarolo, M-G. Tr1 cells: from discovery to their clinical application. *Semin Immunol*, 2006, vol. 18, n. 2, s. 120-127.
8. Baroni, A., Orlando, M., Donnarumma, G., Farro, P., Iovene, M.R., Buommino, E. Toll-like receptor 2 (TLR2) mediates intracellular signalling in human keratinocytes in response to *Malassezia furfur*. *Arch Dermatol Res*, 2006, vol. 297, no. 7, s. 280-288.

9. Begon, E., Michel, L., Flageul, B., Beaudoin, I., Jean-Louis, F., Bachelez, H., Dubertret, L., Musette, P. Expression, subcellular localization and cytokinic modulation of Toll-like receptors (TLRs) in normal human keratinocytes: TLR2 up-regulation in psoriatic skin. *Eur J Dermatol*, 2007, vol. 17, no. 6, s. 497-506.
10. Benáková, N. Psoriáza a současné léčebné možnosti. *Interní medicína pro praxi*, 2005, vol. 14, no. 2, s. 88-91.
11. Benáková, N., Štork, J. Léčba psoriázy biologiky. *Čes Slov Derm*, 2006, vol. 81, no. 4, s. 1–11.
12. Bettelli, E., Carrier, Y., Gao, W., Korn, T., Strom, T.B., Oukka, M., Weiner H.L., Kuchroo, V.K. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature*, 2006, vol. 441, no. 7090, s. 235–238.
13. Bevelacqua, V., Libra, M., Mazzarino, M.C., Gangemi, P., Nicotra, G., Curatolo, S., Massimino, D., Plumari, A., Merito, P., Valente, G., Stivala, F., La Greca, S., Malaponte, G. Long pentraxin 3: a marker of inflammation in untreated psoriatic patients. *Int J Mol Med*, 2006, vol. 18, no. 3, s. 415–423.
14. Bhushan, M., McLaughlin, B., Weiss, J.B., Griffiths, C.E. Levels of endothelial cell stimulating angiogenesis factor and vascular endothelial growth factor are elevated in psoriasis. *Br J Dermatol*, 1999, vol. 141, no. 6, s. 1054–1060.
15. Bisikirska, B., Colgan, J., Luban, J., Bluestone, J.A., Herold, K.C. TCR stimulation with modified anti-CD3 mAb expands CD8<sup>+</sup> T cell population and induces CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs. *J Clin Invest*, 2005, vol. 115, no.10, s. 2904–2913.
16. Bockelmann, R., Horn, T., Gollnick, H., Bonnekoh, B. Interferongamma-dependent in vitro model for the putative keratin 17 autoimmune loop in psoriasis: exploration of pharmaco- and gene-therapeutic effects. *Skin Pharmacol Physiol*, 2005, vol. 18, no. 1, s. 42–54.

17. Boffetta, P., Grindley, G., Lindelöf, B. Cancer risk in a population-based cohort of patients hospitalized for psoriasis in Sweden. *J Invest Dermatol*, 2001, vol. 117, no. 6, s. 1531–1537.
18. Boffetta, P., Jourenkova, N., Gustavsson, P. Cancer risk from occupational and environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Cancer Causes Control*, 1997, vol. 8, no. 3, s. 444–472.
19. Borska, L., Andrys, C., Krejsek, J., Hamakova, K., Kremlacek, J., Ettler, K., Fiala, Z. Serum levels of the pro-inflammatory cytokine interleukin-12 and the anti-inflammatory cytokine interleukin-10 in patients with psoriasis treated by the Goeckerman regimen. *Int J Dermatol*, 2008, vol. 47, no. 8, s. 800–805.
20. Borska, L., Andrys, C., Krejsek, J., Hamakova, K., Kremlacek, J., Palicka, V., Ranna, D., Fiala, Z. Genotoxic and apoptotic effects of Goeckerman therapy for psoriasis. *Int J Dermatol*, 2010, vol. 49, no. 3, s. 289–294.
21. Bovenschen, H.J., van Vlijmen-Willems, I.M., van de Kerkhof, P.C., van Erp, P.E. Identification of lesional CD4+ CD25+ Foxp3+ regulatory T cells in Psoriasis. *Dermatology*, 2006, vol. 213, no. 2, s. 111–117.
22. Bovenschen, H.J. *Immunopahtogenesis of psoriasis and treatment interference*. Thesis Radbound University Nijmegen Medical Center, Nijmegen, The Netherlands. 2006, 208 s., ISBN 9090207740/ 9789090207742.
23. Bover, L.C., Cardo-Vila, M., Kuniyasu, A., Sun, J., Rangel, R., Takeya, M., Aggarwal, B.B., Arap, W., Pasqualini, R. A previously unrecognized protein-protein interaction between TWEAK and CD163: Potential biological implications. *J Immunol*, 2007, vol. 178, no. 12, s. 8183–8194.
24. Buechler, C., Ritter, M., Orsó, E., Langmann, T., Klucken, J., Schmitz, G. Regulation of scavenger receptor CD163 expression in human monocytes and macrophages by pro- and antiinflammatory stimuli. *J Leukoc Biol*, 2000, vol. 67, no. 1, s. 97–103.

25. Büchau, A.S., Gallo, R.L. Innate immunity and antimicrobial defense systems in psoriasis. *Clin Dermatol*, 2007, vol. 25, no. 6, s. 616–624.
26. Curry, J.L., Qin, J-Z., Bonish, B., Carrick, R., Bacon, P., Panella, J., Robinson, J., Nickoloff, B.J. Innate immune-related receptors in normal and psoriatic skin. *Arch Pathol Lab Med*, 2003, vol. 127, no. 2, s. 178–186.
27. Das, R.P., Jain, A.K., Ramesh, V. Current concepts in the pathogenesis of psoriasis. *Indian J Dermatol*, 2009, vol. 54, no. 1, s. 7–12.
28. de Boer, O.J., van der Loos, C.M., Teeling, P., van der Wal, A.C., Teunissen, M.B. Immunohistochemical analysis of regulatory T cell markers FOXP3 and GITR on CD4+CD25+ T cells in normal skin and inflammatory dermatoses. *J Histochem Cytochem*, 2007, vol. 55, no. 9, s. 891–898.
29. de Miguel, R., el-Azhary, R. Efficacy, safety, and cost of Goeckerman therapy compared with biologics in the treatment of moderate to severe psoriasis. *Int J Dermatol*, 2009, vol. 48, no. 6, s. 653–658.
30. Dieckmann, D., Plottner, H., Berchtold, S., Berger, T., Schuler, G. Ex vivo isolation and characterization of CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties from human blood. *J Exp Med*, 2001, vol. 193, no. 11, s. 1303–1310.
31. Ditrichova, D. Ichтамol a dehty v současné dermatologické terapii. *Klin Farmakol Farm*, 2005, vol. 19, s. 47–48.
32. Drozenová, H. Lupénka. *Dermatol. praxi*. Olomouc: SOLEN, s. r. o., 2008, vol. 2, no. 3, s. 121-125. ISSN 1802-2960.
33. Dulay, A.T., Buhimschi, C.S., Zhao, G., Oliver, E.A., Mbele, A., Jing, S., Buhimschi, I.A. Soluble TLR2 is present in human amniotic fluid and modulates the intraamniotic inflammatory response to infection. *J Immunol*, 2009, vol. 182, no. 11, s. 7244–7253.

34. Elder, J.T., Bruce, A.T., Gudjonsson, J.E., Johnston, A., Stuart, P.E., Tejasvi, T., Voorhees, J.J., Abecasis, G.R., Nair, R.P. Molecular dissection of psoriasis: integrating genetics and biology. *J Invest Dermatol*, 2010, vol. 130, no. 5, s. 1213–1226.
35. Ettler, K. Biological treatment in dermatology-psoriasis. *Vnitr Lek*, 2011, vol. 57, no. 9, s. 684–692.
36. Feighery, C., Dunne, J., Bingham, E.A., Feighery, C.F. Evaluation of soluble CD163 as a marker of inflammation in psoriasis. *Clin Exp Dermatol*, 2011, vol. 36, no. 2, s. 201–203.
37. Fernandez, A.Z., López, F., Tablante, A., Romano, E., Hurt-Camejo, E., Camejo, G., Apitz-Castro, R. Intravascular hemolysis increases atherogenicity of diet-induced hypercholesterolemia in rabbits in spite of heme oxygenase-1 gene and protein induction. *Atherosclerosis*, 2001, vol. 158, no. 1, 103–111.
38. Fiala, Z., Borska, L., Pastorkova, A., Kremlacek, J., Cerna, M., Smejkalova, J., Hamakova, K. Genotoxic effect of Goeckerman regimen of psoriasis. *Arch Dermatol Res*, 2006, vol. 298, no. 5, s. 243–51.
39. Fontenot, J.D., Rasmussen, J.P., Williams, L.M., Dooley, J.L., Farr, A.G., Rudensky, A.Y. Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3. *Immunity*, 2005, vol. 22, no. 3, s. 329–341.
40. Fontenot, J.D., Rudensky, A. A well adapted regulatory contrivance: regulatory T cell development and the forkhead family transcription factor Foxp3. *Nat Immunol*, 2005, vol. 6, no. 4, s. 331–337.
41. Fortune, D.G., Richards, H.L., Kirby, B., McElhone, K., Markham, T., Rogers, S., Main, C.J., Griffiths, C.E. Psychological distress impair clearance of psoriasis in patients treated with photochemotherapy. *Arch Dermatol*, 2003, vol. 139, no. 6, s. 752–756.
42. Frings, W., Dreier, J., Sorg, C. Only the soluble form of the scavenger receptor CD163 acts inhibitory on phorbol ester-activated T-lymphocytes, whereas membrane-bound protein has no effect. *FEBS Lett*, 2002, vol. 526, no. 1-3, s. 93–96.

43. Fuentes-Duculan, J., Suárez-Fariñas, M., Zaba, L.C., Nograies, K.E., Pierson, K.C., Mitsui, H., Pensabene, C.A., Kzhyshkowska, J., Krueger, J.G., Lowes, M.A. A subpopulation of CD163-positive macrophages is classically activated in psoriasis. *J Invest Dermatol*, 2010, vol. 130, no. 10, s. 2412–2422.
44. Furuhashi, T., Torii, K., Kato, H., Nishida, E., Saito, C., Morita, A. Efficacy of excimer light therapy (308 nm) for palmoplantar pustulosis with the induction of circulating regulatory T cells. *Exp Dermatol*, 2001, vol. 20, no. 9, s. 768–770.
45. Furuzawa-Carballeda, J., Vargas-Rojas, M.I., Cabral, A.R. Autoimmune inflammation from the Th17 perspective. *Autoimmun Rev*, 2006, vol. 6, no. 3, s. 169–175.
46. Gañi, S., Pedersen, S.S., Koldkaer, O.G., Pedersen, C., Moestrup, S.K., Møller, H.J. New immunological serum markers in bacteraemia: anti-inflammatory soluble CD163, but not proinflammatory high mobility group-box 1 protein, is related to prognosis. *Clin Exp Immunol*, 2008, vol. 151, no. 3, s. 423–431.
47. Gao, L., Li, K., Li, F., Li, H., Liu, L., Wang, L., Zhang, Z., Gao, T., Liu, Y. Polymorphisms in the FOXP3 gene in Han Chinese psoriasis patients. *J Dermatol Sci*, 2010, vol. 57, no. 1, s. 51–56.
48. Gaspari, A.A. Innate and adaptive immunity and the pathophysiology of psoriasis. *J Am Acad Dermatol*, 2006, vol. 54, no. 3 suppl 2, s. 67-80.
49. Gelfand, J.M., Troxel, A.B., Lewis, J.D., Kurd, S.K., Shin, D.B., Wang, X., Margolis, D.J., Strom, B.L. The risk of mortality in patients with psoriasis: results from a population-based study. *Arch Dermatol*, 2007, vol. 143, no. 12, s. 1493–1499.
50. Gershon, R.K., Kondo, K. Infectious immunological tolerance. *Immunology*, 1971, vol. 21, no. 6, s. 903–914.
51. Goeckerman, W.H. Treatment of psoriasis. *Northwest Med*, 1925, vol. 24, s. 229–231.



52. Goldstein, J.I., Goldstein, K.A., Wardwell, K., Fahrner, S.L., Goonan, K.E., Cheney, M.D., Yeager, M.P., Guyre, P.M.. Increase in plasma and surface CD163 levels in patients undergoing coronary artery bypass graft surgery. *Atherosclerosis*, 2003, vol. 170, no. 2, s. 325–332.
53. Gondek, D.C., Lu, L.F., Quezada, S.A., Sakaguchi, S., Noelle, R.J. Cutting Edge: Contact-mediated suppression by CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism. *J Immunol*, 2005, vol. 174, no. 4, s. 1783–1786.
54. Goodfield, M., Kownacki, S., Berth-Jones, J. Double-blind, randomised, multicentre, parallel group study comparing 1% coal tar preparation with 5% coal tar preparation in psoriasis. *J Dermatol Treat*, 2004, vol. 15, no. 1, s. 14–22.
55. Goodman, W.A., Levine, A.D., Massari, J.V., Sugiyama, H., McCormick, T.S., Cooper, K.D. IL-6 signaling in psoriasis prevents immune suppression by regulatory T cells. *J Immunol*, 2009, vol. 183, no. 5, s. 3170–3176.
56. Grant, J., Bourcier, K., Wallace, S., Pan, D., Conway, A., Seyfert-Margolis, V., Wallace, P.K. Validated protocol for FoxP3 reveals increased expression in type 1 diabetes patients. *Cytometry B Clin Cytom*, 2009, vol. 76, no. 2, s. 69–78.
57. Graversen, J.H., Madsen, M., Moestrup, S.K. CD163: a signal receptor scavenging haptoglobin-hemoglobin complexes from plasma. *Int J Biochem Cell Biol*, 2002, vol. 34, no. 3, s. 309–314.
58. Griffiths, C.E., Barker, J.N. Pathogenesis and clinical features of psoriasis. *Lancet*. 2007, vol. 370, no. 9583, s. 263–271.
59. Grossman, W.J., Verbsky, J.W., Barchet, W., Collona, M., Atkinson, J.P., Ley, T.J. Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death. *Immunity*, 2004, vol. 21, no. 4, s. 589–601.

60. Guetta, J., Strauss, M., Levy, N.S., Fahoum, L., Levy, A.P. Haptoglobin genotype modulates the balance of Th1/Th2 cytokines produced by macrophages exposed to free hemoglobin. *Atherosclerosis*, 2007, vol. 191, no. 1, s. 48–53.
61. Hannuksela-Svahn, A., Pukkala, E., Läärä, E., Poikolainen, K., Karvonen, J. Psoriasis, its treatment, and cancer in a cohort of Finnish patients. *J Invest Dermatol*, 2000, vol. 114, no. 3, s. 587–590.
62. Hargreaves, D.C., Medzhitov, R. Innate sensors of microbial infection. *J Clin Immunol*, 2005, vol. 25, no. 6, s. 503–510.
63. Hausmann, M., Kiessling, S., Mestermann, S., Webb, G., Spöttl, T., Andus, T., Schölmerich, J., Herfarth, H., Ray, K., Falk, W., Rogler, G. Toll-like receptors 2 and 4 are up-regulated during intestinal inflammation. *Gastroenterology*, 2002, vol. 122, no. 7, s. 1987–2000.
64. Higashi-Kuwata, N., Makino, T., Inoue, Y., Takeya, M., Ihn, H. Alternatively activated macrophages (M2 macrophages) in the skin of patient with localized scleroderma. *Exp Dermatol*, 2009, vol. 18, no. 8, s. 727–729.
65. Hintz, K.A., Rassias, A.J., Wardwell, K., Moss, M.L., Morganelli, P.M., Pioli, P.A., Givan, A.L., Wallace, P.K., Yeager, M.P., Guyre, P.M. Endotoxin induces rapid metalloproteinase-mediated shedding followed by up-regulation of the monocyte hemoglobin scavenger receptor CD163. *J Leukoc Biol*, 2002, vol. 72, no. 4, s. 711–717.
66. Hirahara, K., Liu, L., Clark, R.A., Yamanaka, K., Fuhlbrigge, R.C., Kupper, T.S. The Majority of Human Peripheral Blood CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>Foxp3<sup>+</sup> Regulatory T Cells Bear Functional Skin-Homing Receptors. *J Immunol*, 2006, vol. 177, no. 7, s. 4488–4494.
67. Hofmeister, R., Khaled, A.R., Benbernou, N., Rajnavolgyi, E., Muegge, K., Durum, S.K. Interleukin-7: physiological roles and mechanisms of action. *Cytokine Growth factor rev*, 1999, vol. 10, no. 1, s. 41–60.

68. Högger, P., Sorg, C. Soluble CD163 inhibits phorbol ester-induced lymphocyte proliferation. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, vol. 288, no. 4, s. 841–843.
69. Huber, S., Schramm, C., Lehr, H.A., Mann, A., Schmitt, S., Becker, C., Protschka, M., Galle, P.R., Neurath, M.F., Blessing, M. Cutting Edge: TGF- $\beta$  signaling is required for the in vivo expansion and immunosuppressive capacity of regulatory CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells. *J Immunol*, 2004, vol. 173, no. 11, s. 6526–6531.
70. Hueber, A.J., McInnes, I.B. Immune regulation in psoriasis and psoriatic arthritis--recent developments. *Immunol Lett*, 2007, vol. 114, no. 2, s. 59–65.
71. Chen, L., Shen, Z., Wang, G., Fan, P., Liu, Y. Dynamic frequency of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg cells in Psoriasis vulgaris. *J Dermatol Sci*, 2008, vol. 51, no. 3, s. 200–203.
72. Chen, W., Jin, W., Hardegen, N., Lei, K.J., Li, L., Marinos, N., McGrady, G., Wahl, S.M. Conversion of peripheral CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> naive T cells to CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells by TGF- $\beta$  induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med*, 2003, vol. 198, no. 12, s. 1875–1886.
73. Iwahashi, M., Yamamura, M., Aita, T., Okamoto, A., Ueno, A., Ogawa, N., Akashi, S., Miyake, K., Godowski, P.J., Makino, H. Expression of Toll-like receptor 2 on CD16<sup>+</sup> blood monocytes and synovial tissue macrophages in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 2004, vol. 50, no. 5, s. 1457–1467.
74. Jonuleit, H., Schmitt, E., Stassen, M., Tuettenberg, A., Knop, J., Enk, A.H. Identification and functional characterization of human CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood. *J Exp Med*, 2001, vol. 193, no. 11, s. 1285–1294.
75. Joosten, S.A., Ottenhoff, T.H. Human CD4 and CD8 regulatory T cells in infectious diseases and vaccination. *Hum Immunol*, 2008, vol. 69, no. 11, s. 760–770.
76. Kim, S.K., Park, S., Lee, E-S. Toll-like receptors and antimicrobial peptides expressions of psoriasis: correlation with serum vitamin D level. *J Korean Med Sci*, 2010, vol. 25, no. 10, s. 1506–1512.

77. Kimball, A.B., Kupper, T.S. Future perspectives/quo vadis psoriasis treatment? Immunology, pharmacogenomics, and epidemiology. *Clin Dermatol*, 2008, vol. 26, no. 5, s. 554–561.
78. Kohm, A.P., Carpentier, P.A., Anger, H.A., Miller, S.D. Cutting edge: CD4+CD25+ regulatory T cells suppress antigen-specific autoreactive immune responses and central nervous system inflammation during active experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*, 2002, vol. 169, no. 9, s. 4712–4716.
79. Kolackova, M., Kudlova, M., Kunes, P., Lonsky, V., Mandak, J., Andrys, C., Jankovicova, K., Krejsek, J. Early expression of FcγRI (CD64) on monocytes of cardiac surgical patients and higher density of monocyte anti-inflammatory scavenger CD163 receptor in "on-pump" patients. *Mediators Inflamm*, 2008, 2008:235461.
80. Kolackova, M., Lonsky, V., Trojackova, Kudlova, M., Mandak, J., Kunes, P., Svitek, V., Jankovicova, K., Vlaskova, D., Andrys, C., Krejsek, J. Serum level of sCD163, a soluble receptor for hemoglobin, is influenced by cardiac surgery. *Perfusion*, 2009, vol. 24, no. 4, s. 263–269.
81. Kortuem, K.R., Davis, M.D.P., Witman, P.M., McEvoy, M.T., Farmer, S.A. Results of Goeckerman Treatment for Psoriasis in Children: A 21-Year Retrospective Review. *Pediatric Dermatology*, 2010, vol. 27, no. 5, s. 518–524.
82. Krejsek, J., Kunes, P., Kolackova, M., Kudlova, M., Lonsky, V., Mandak, J., Andrys, C. The expression of Toll-like receptor 2 and 4 on innate immunity cells is modulated by cardiac surgical operation. *Scand J Clin Lab Invest*, 2008, vol. 68, no. 8, s. 749–758.
83. Kristiansen, M., Graversen, J.H., Jacobsen, C., Sonne, O., Hoffman, H.J., Law, S.K., Moestrup, S.K. Identification of the haemoglobin scavenger receptor. *Nature*, 2001, vol. 409, no. 6817, s. 198–201.

84. Kursar, M., Bonhagen, K., Fensterle, J., Köhler, A., Hurwitz, R., Kamradt, T., Kaufmann, S.H., Mittrücker, H.W. Regulatory CD4+CD25+ T Cells Restrict Memory CD8+ T Cell Responses. *J Exp Med*, 2002, vol. 196, no. 12, s. 1585–1592.
85. Lan, R.Y., Mackay, J.R., Gershwin, M.E. Regulatory T cells in the prevention of mucosal inflammatory diseases: Patrolling the border. *J Autoimmun*, 2007, vol. 29, no. 4, s. 272–280.
86. Lande, R., Gregorio, J., Facchinetti, V., Chatterjee, B., Wang, Y.H., Homey, B., Cao, W., Wang, Y.H., Su, B., Nestle, F.O., Zal, T., Mellman, I., Schröder, J.M., Liu, Y.J., Gilliet, M. Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide. *Nature*, 2007, vol. 449, no. 7162, s. 564–569.
87. Langlois, M.R., Delanghe, J.R. Biological and clinical significance of haptoglobin polymorphism in humans. *Clin Chem*, 1996, vol. 42, no. 10, s. 1589–1600.
88. LeBouder, E., Rey-Nores, J.E., Rushmere, N.K., Grigorov, M., Lawn, S.D., Affolter, M., Griffin, G.E., Ferrara, P., Schiffrin, E.J., Morgan, B.P., Labéta, M.O. Soluble form of Toll-like receptor (TLR)2 capable of modulating TLR2 signaling are present in human plasma and breast milk. *J Immunol*, 2003, vol. 171, no. 12, s. 6680–6689.
89. Lebwohl, M., Ali, S. Treatment of psoriasis. Part 1. Topical therapy and phototherapy. *J Am Acad Dermatol*, 2001, vol. 45, no. 4, s. 487–498.
90. Li, Y.Y., Zollner, T.M., Schön, M.P. Targeting leukocyte recruitment in the treatment of psoriasis. *Clin Dermatol*, 2008, vol. 26, no. 5, s. 527–538.
91. Liu, W., Putnam, A.L., Xu-Yu, Z., Szot, G.L., Lee, M.R., Zhu, S., Gottlieb, P.A., Karanov, P., Gingeras, T.R., Fazekas de St Groth, B., Clayberger, C., Soper, D.M., Ziegler, S.F., Bluestone, J.A. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. *J Exp Med*, 2006, vol. 203, no. 7, s. 1701–1711.
92. Lohr, J., Knoechel, B., Caretto, D., Abbas, A.K. Balance of Th1 and Th17 effector and peripheral regulatory T cells. *Microbes Infect*, 2009, vol. 11, no. 5, s. 589–593.

93. Madsen, M., Møller, H.J., Nielsen, M.J., Jacobsen, C., Graversen, J.H., van den Berg, T., Moestrup, S.K. Molecular characterization of the haptoglobin-hemoglobin receptor CD163. Ligand binding properties of the scavenger receptor cysteine-rich domain region. *J Biol Chem*, 2004, vol. 279, no. 49, s. 51561–51567.
94. Maeda, A., Beissert, S., Schwarz, T., Schwarz, A. Phenotypic and functional characterization of ultraviolet radiation-induced regulatory T cells. *J Immunol*, 2008, vol. 180, no. 5, s. 3065–3071.
95. Mantovani, A., Sica, A., Locati, M. New vistas on macrophage differentiation and activation. *Eur J Immunol*, 2007, vol. 37, no. 1, s. 14–16.
96. Martinez, F.O., Helming, L., Gordon, S. Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. *Annu Rev Immunol*, 2009, vol. 27, s. 451–483.
97. McGarry, G.W., Robertson, J.R. Scrotal carcinoma following prolonged use of crude coal tar ointment. *Br J Urol*, 1989, vol. 63, no. 2, s. 211.
98. Mita, Y., Dobashi, K., Endou, K., Kawata, T., Shimizu, Y., Nakazawa, T., Mori, M. Toll-like receptor 4 surface expression on human monocytes and B cells is modulated by IL-2 and IL-4. *Immunol Lett*, 2002, vol. 81, no. 1, s. 71–75.
99. Moniuszko, M., Kowal, K., Rusak, M., Pietruczuk, M., Dabrowska, M., Bodzenta-Lukaszyk, A. Monocyte CD163 and CD36 expression in human whole blood and isolated mononuclear cell samples: influence of different anticoagulants. *Clin Vaccine Immunol*, 2006, vol. 13, no. 6, s. 704–707.
100. Mosmann, T.R., Coffman, R.L. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol*, 1989, vol. 7, s. 145–173.
101. Mrowietz, U., Reich, K. Psoriasis - new insights into pathogenesis and treatment. *Dtsch Arztebl Int*, 2009, vol. 106, no. 1-2, s. 11–18.

102. Nair, R.P., Stuart, P.E., Nistor, I., Hiremagalore, R., Chia, N.V., Jenisch, S., Weichenthal, M., Abecasis, G.R., Lim, H.W., Christophers, E., Voorhees, J.J., Elder, J.T. Sequence and haplotype analysis supports HLA-C as the psoriasis susceptibility 1 gene. *Am J Hum Genet*, 2009, vol. 78, no. 5, s. 827–851.
103. Nestle, F.O., Conrad, C., Tun-Kyi, A., Homey, B., Gombert, M., Boyman, O., Burg, G., Liu, Y.J., Gilliet, M. Plasmacytoid predendritic cells initiate psoriasis through interferon-alpha production. *J Exp Med*, 2005, vol. 202, no. 1, s. 135–143.
104. Ng, W.F., Duggan, P.J., Ponchel, F., Matarese, G., Lombardi, G., Edwards, A.D., Isaacs, J.D., Lechler, R.I. Human CD4(+)CD25(+) cells: a naturally occurring population of regulatory T cells. *Blood*, 2001, vol. 98, no. 9, s. 2736–2744.
105. Nielsen, M.J., Madsen, M., Møller, H.J., Moestrup, S.K. The macrophage scavenger receptor CD163: endocytic properties of cytoplasmic tail variants. *J Leukoc Biol*, 2006, vol. 79, no. 4, s. 837–845.
106. Nistala, K., Wedderburn, L.R. Th17 and regulatory T cells: rebalancing pro- and anti-inflammatory forces in autoimmune arthritis. *Rheumatology (Oxford)*, 2009, vol. 48, no. 6, s. 602–606.
107. Nograles, K.E., Davidovici, B., Krueger, J.G. New insights in the immunologic basis of psoriasis. *Semin Cutan Med Surg*, 2010, vol. 29, no. 1, s. 3–9.
108. Ohashi, K., Burkart, V., Flohé, S., Kolb, H. Cutting edge: Heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the Toll-like receptor-4 complex. *J Immunol*, 2000, vol. 164, no. 2, s. 558–561.
109. Ochs, H.D., Oukka, M., Torgerson, T.R. TH17 cells and regulatory T cells in primary immunodeficiency diseases. *J Allergy Clin Immunol*, 2009, vol. 123, no. 9, s. 977–983.
110. Onofre, G., Kolackova, M., Jankovicova, K., Krejsek, J. Scavenger receptor CD163 and its biological functions. *Acta Medica (Hradec Kralove)*, 2009, 52, s. 57–61.

111. Philippidis, P., Mason, J.C., Evans, B.J., Nadra, I., Taylor, K.M., Haskard, D.O., Landis, R.C. Hemoglobin scavenger receptor CD163 mediates interleukin-10 release and heme oxygenase-1 synthesis: antiinflammatory monocyte-macrophage responses in vitro, in resolving skin blisters in vivo, and after cardiopulmonary bypass surgery. *Circ Res*, 2004, vol. 94, no. 1, s. 119–126.
112. Piccirillo, C.A., Shevach, E.M. Control of CD8<sup>+</sup> T cell activation by CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> immunoregulatory cells. *J Immunol*, 2001, vol. 167, no. 3, s. 1137–1140.
113. Pietrzak, A.T., Zalewska, A., Chodorowska, G., Krasowska, D., Michalak-Stoma, A., Nockowski, P., Osemlak, P., Paszkowski, T., Roliński, J.M. Cytokines and anticytokines in psoriasis. *Clin Chim Acta*, 2008, vol. 394, no. 1-2, s. 7–21.
114. Pincelli, C. Nerve growth factor and keratinocytes: a role in psoriasis. *Eur J Dermatol*, 2000, vol. 10, no. 2, s. 85–90.
115. Piolo, P.A., Goonan, K.E., Wardwell, K., Guyre, P.M. TGF-beta regulation of human macrophage scavenger receptor CD163 is Smad3-dependent. *J Leukoc Biol*, 2004, vol. 76, no. 2, s. 500–508.
116. Pittelkow, M.R., Perry, O.H., Muller, S.A., Maughan, W.Z., O'Brien, P.C. Skin Cancer in Patients With Psoriasis Treated With Coal Tar. A 25-year follow-up study. *Arch Dermatol*, 1981, vol. 117, no. 8, s. 465–468.
117. Quaglino, P., Bergallo, M., Ponti, R., Barberio, E., Cicchelli, S., Buffa, E., Comessatti, A., Costa, C., Terlizzi, M.E., Astegiano, S., Novelli, M., Cavallo, R., Bernengo, M.G. Th1, Th2, Th17 and regulatory T cell pattern in psoriatic patients: modulation of cytokines and gene targets induced by etanercept treatment and correlation with clinical response. *Dermatology*, 2011, vol. 223, no. 1, s. 57–67.
118. Raby, A.C., Le Boude, E., Colmont, C., Davies, J., Richards, P., Coles, B., George, C.H., Jones, S.A., Brennan, P., Topley, N., Labéta, M.O. Soluble TLR2 reduces inflammation without compromising bacterial clearance by disrupting TLR2 triggering. *J Immunol*, 2009, vol. 183, no. 1, s. 506–517.



119. Ralainirina, N., Poli, A., Michael, T., Poos, L., Andrès, E., Hentges, F., Zimmer, J. Control of NK cell functions by CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Leukoc Biol*, 2007, vol. 81, no. 1, s. 144–153.
120. Rapp SR, Feldman SR, Exum LM, Fleischer AB Jr, Reboussin DM. Psoriasis causes as much disability as other major medical diseases. *J Am Acad Dermatol*, 1999, vol. 41, no. 3 Pt 1, s. 401–407.
121. Ritter, M., Buechler, C., Langmann, T., Schmitz, G. Genomic organization and chromosomal localization of the human CD163 (M130) gene: a member of the scavenger receptor cysteine-rich superfamily. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, vol. 260, no. 2, s. 466–474.
122. Reaves, T.A., Chin, A.C., Parkos, C.A. Neutrophil transepithelial migration: role of toll-like receptors in mucosal inflammation. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2005, vol. 100 Suppl 1, s. 191–198.
123. Roelofzen, J.H., Aben, K.K., van der Valk, P.G., Houtum, J.L., van de Kerkhof, P.C., Kiemeneij, L.A. Coal tar in dermatology. *J Dermatolog Treat*, 2007, vol. 18, no. 6, s. 329–334.
124. Rostová, J., Borská, L., Fiala, Z., Krejsek, J. Akutní účinek UV záření na imunitní systém. *Voj Zdrav Listy*, 2006, vol. 75, no. 2, s. 56–64.
125. Rostová, J., Borská, L., Fiala, Z., Krejsek, J. Chronické účinky UV záření na organismus. *Voj Zdrav Listy*, 2006, vol. 75, no. 1, s. 17–24.
126. Rostová, J., Borská, L., Fiala, Z., Krejsek, J. Vybrané akutní účinky UV záření na organismus. *Voj Zdrav Listy*, 2006, vol. 75, no. 3/4, s. 111–117.
127. Saito, C., Maeda, A., Morita, A. Bath-PUVA therapy induces circulating regulatory T cells in patients with psoriasis. *J Dermatol Sci*, 2009, vol. 53, no. 3, s. 231–233.

128. Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M., Toda, M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol*, 1995, vol. 155, no. 3, s. 1151–1164.
129. Sakaguchi, S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol*, 2005, vol. 6, no. 4, s. 345–352.
130. Sanchez, A.P. Immunopathogenesis of psoriasis. *An Bras Dermatol*, 2010, vol. 85, no.5, s. 747–749.
131. Seung, N.R., Park, E.J., Kim, C.W., Kim, K.H., Kim, K.J., Cho, H.J., Park, H.R. Comparison of expression of heat-shock protein 60, Toll-like receptors 2 and 4, and T-cell receptor  $\gamma\delta$  in plaque and guttate psoriasis. *J Cutan Pathol*, 2007, vol. 34, no. 12, s. 903–911.
132. Shehata, I.H., Elghandour, T.M. A possible pathogenic role of CD4+CD25+ T-regulatory cells in psoriasis. *Egypt J Immunol*, 2007, vol. 14, no. 1, s. 21–31.
133. Schaer, C.A., Schoedon, G., Imhof, A., Kurrer, M.O., Schaer, D.J. Constitutive endocytosis of CD163 mediates hemoglobin-heme uptake and determines the noninflammatory and protective transcriptional response of macrophages to hemoglobin. *Circ Res*, 2006, vol. 99, no. 9, s. 943–950.
134. Schaer, C.A., Vallelian, F., Imhof, A., Schoedon, G., Schaer, D.J. Heme carrier protein (HCP-1) spatially interacts with the CD163 hemoglobin uptake pathway and is a target of inflammatory macrophage activation. *J Leukoc Biol*, 2008, vol. 83, no. 2, s. 325–333.
135. Schwarz, A., Maeda, A., Wild, M.K., Kernebeck, K., Gross, N., Aragane, Y., Beissert, S., Vestweber, D., Schwarz, T. Ultraviolet radiation-induced regulatory T cells not only inhibit the induction but can suppress the effector phase of contact hypersensitivity. *J Immunol*, 2004, vol. 172, no. 2, s. 1036–1043.
136. Slíva J. Nová image antipsoriatic. *Farmi news*, ISSN: 1214-5017, 2011, vol. 8, no. 3, s. 5.

137. Slonková, V. Ustekinumab - nová možnost terapie psoriázy. *Praktické lékařství*, Olomouc, Solen s.r.o. ISSN 1801-2434, 2011, vol. 7, no. 2, s. 55–57.
138. Stern, R.S., Zierler, S., Parish, J.A. Skin carcinoma in patients with psoriasis treated with topical tar and artificial ultraviolet radiation. *Lancet*, 1980, vol. 1, no. 8171, s. 732–735.
139. Strauss, M., Levy, A.P. Regulation of CD163 associated casein kinase II activity is haptoglobin genotype dependent. *Mol Cell Biochem*, 2008, vol. 317, no. 1-2, s. 131–135.
140. Sugiyama, H., Gyulai, R., Toichi, E., Garaczi, E., Shimada, S., Stevens, S.R., McCormick, T.S., Cooper, K.D. Dysfunctional blood and target tissue CD4+CD25high regulatory T cells in psoriasis: mechanism underlying unrestrained pathogenic effector T cell proliferation. *J Immunol*, 2005, vol. 174, no. 1, s. 164–173.
141. Sulahian, T.H., Hintz, K.A., Wardwell, K., Guyre, P.M. Development of an ELISA to measure soluble CD163 in biological fluids. *J Immunol Methods*, 2001, vol. 252, no. 1-2, s. 25–31.
142. Sulahian, T.H., Högger, P., Wahner, A.E., Wardwell, K., Goulding, N.J., Sorg, C., Droste, A., Stehling, M., Wallace, P.K., Morganelli, P.M., Guyre, P.M. Human monocytes express CD163, which is upregulated by IL-10 and identical to p155. *Cytokine*, 2000, vol. 12, no. 9, s. 1312–1321.
143. Sulahian, T.H., Pioli, P.A., Wardwell, K., Guyre, P.M. Cross-linking of FcγR triggers shedding of the hemoglobin-haptoglobin scavenger receptor CD163. *J Leukoc Biol*, 2004, vol. 76, no. 1, s. 271–277.
144. Taams, L.S., Van Amelsfort, J.M., Tiemessen, M.M., Jacobs, K.M., de Jong, E.C., Akbar, A.N., Bijlsma, J.W., Lafeber, F.P. Modulation of monocyte/macrophage function by human CD4+CD25+ regulatory T cells. *Hum Immunol*, 2005, vol. 66, no. 3, s. 222–230.
145. Takeda, K., Akira, S. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol*, 2005, vol. 17, no. 1, s. 1–14.

146. Tamandl, D., Bahrami, M., Wessner, B., Weigel, G., Ploder, M., Fürst, W., Roth, E., Boltz-Nitulescu, G., Spittler, A. Modulation of Toll-like receptor 4 expression on human monocytes by tumor necrosis factor and interleukin-6: tumor necrosis factor evokes lipopolysaccharide hyporesponsiveness, whereas interleukin-6 enhances lipopolysaccharide activity. *Shock*, 2003, vol. 20, no. 3, s. 224–229.
147. Thami, G.P., Sarmat, R. Coal tar: past, present and future. *Clin Exp Dermatol*, 2002, vol. 27, no. 2, s. 99–103.
148. Thornton, A.M., Shevach, E.M. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med*, 1998, vol. 188, no. 2, s. 287–296.
149. Travers, J.B., Hamid, Q.A., Norris, D.A., Kuhn, C., Giorno, R.C., Schlievert, P.M., Farmer, E.R., Leung, D.Y. Epidermal HLA-DR and the enhancement of cutaneous reactivity to superantigenic toxins in psoriasis. *J Clin Invest*, 1999, vol. 104, no. 9, s. 1181–1189.
150. Trembath, R.C., Clough, R.L., Rosbotham, J.L., Jones, A.B., Camp, R.D., Frodsham, A., Browne, J., Barber, R., Terwilliger, J., Lathrop, M., Barker, J.N. Identification of a major susceptibility locus on chromosome 6p and evidence for further disease loci revealed by a two stage genome-wide search in psoriasis. *Hum Mol Genet*, 1997, vol. 6, no. 5, s. 813–820.
151. Trzonkowski, P., Szmit, E., Mysliwska, J., Dobyszek, A., Myśliwski, A. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T regulatory cells inhibit cytotoxic activity of T CD8<sup>+</sup> and NK lymphocytes in the direct cell-to-cell interaction. *Clin Immunol*, 2004, vol. 112, no. 3, s. 258–267.
152. Valdimarsson, H., Thorleifsdottir, R.H., Sigurdardottir, S.L., Gudjonsson, J.E., Johnston, A. Psoriasis - as an autoimmune disease caused by molecular mimicry. *Trends Immunol*, 2009, vol. 30, no. 10, s. 494–501.
153. Vandooren, B., Noordenbos, T., Ambarus, C., Krausz, S., Cantaert, T., Yeremenko, N., Boumans, M., Lutter, R., Tak, P.P., Baeten, D. Absence of a classically activated macrophage cytokine signature in peripheral spondylarthritis, including psoriatic arthritis. *Arthritis Rheum*, 2009, vol. 60, no. 4, s. 966–975.

154. Veldhoen, M., Hocking, R.J., Atkins, C.J., Locksley, R.M., Stockinger, B. TGF beta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity*, 2006, vol. 24, no. 2, s. 179–189.
155. Venken, K., Hellings, N., Broekmans, T., Hensen, K., Rummens, J.L., Stinissen, P. Natural naive CD4+CD25+CD127low regulatory T cell (Treg) development and function are disturbed in multiple sclerosis patients: recovery of memory Treg homeostasis during disease progression. *J Immunol*, 2008, vol. 180, no. 9, s. 6411–6420.
156. Verhagen, J., Akdis, M., Traidl-Hoffmann, C., Schmid-Grendelmeier, P., Hijnen, D., Knol, E.F., Behrendt, H., Blaser, K., Akdis, C.A. Absence of T-regulatory cell expression and function in atopic dermatitis skin. *J Allergy Clin Immunol*, 2006, vol. 117, no. 1, s. 176–183.
157. Veselá, I., Stříž, I. T regulační buňky a jejich úloha v imunitních reakcích. *Alergie*, 2004, vol. 1, s. 43–52.
158. Vestergaard, C., Just, H., Baumgartner Nielsen, J., Thestrup-Pedersen, K., Deleuran, M. Expression of CCR2 on monocytes and macrophages in chronically inflamed skin in atopic dermatitis and psoriasis. *Acta Derm Venereol*, 2004, vol. 84, no. 5, s. 353–358.
159. Vigouroux, S., Yvon, E., Biagi, E., Brenner, M.K. Antigen-induced regulatory T cells. *Blood*, 2004, vol. 104, no. 1, s. 26–33.
160. Vojdani, A., Erde, J. Regulatory T cells, a potent immunoregulatory target for CAM researchers: modulating tumor immunity, autoimmunity and alloreactive immunity (III). *eCAM*, 2006, vol. 3, no. 3, s. 309–316.
161. Wang, H., Paters, T., Sindrilaru, A., Kess, D., Oreshkova, T., Yu, X., Seier, A.M., Schreiber, H., Wlachek, M., Blakytyn, R., Röhrbein, J., Schulz, G., Weiss, J.M., Scharffetter-Kochanek, K. TGF- $\beta$ -dependent suppressive function of Tregs requires wild-type levels of CD18 in a mouse model of psoriasis. *J Clin Invest*, 2008, vol. 118, no. 7, s. 2629–2639.

162. Weaver, L.K., Hintz-Goldstein, K.A., Pioli, P.A., Wardwell, K., Qureshi, N., Vogel, S.N., Guyre, P.M. Pivotal advance: activation of cell surface Toll-like receptors causes shedding of the hemoglobin scavenger receptor CD163. *J Leukoc Biol*, 2006, vol. 80, no.1, s. 26–35.
163. Weaver, L.K., Pioli, P.A., Wardwell, K., Vogel, S.N., Guyre, P.M. Up-regulation of human monocyte CD163 upon activation of cell-surface Toll-like receptors. *J Leukoc Biol*, 2007, vol. 81, no. 3, s. 663–671.
164. Welch, S.K., Galvert, J.G. A brief review of CD163 and its role in PRRSV infection. *Virus Res*, 2010, vol. 154, no. 1-2, s. 98–103.
165. Wing, K., Onishi, Y., Prieto-Martin, P., Yamaguchi, T., Miyara, M., Fehervari, Z., Nomura, T., Sakaguchi, S. CTLA-4 control over Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cell function. *Science*, 2008, vol. 322, no. 5899, s. 271–275.
166. Yang, J., Chu, Y., Yang, X., Gao, D., Zhu, L., Yang, X., Wan, L., Li, M. Th17 and natural Treg cell population dynamics in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*, 2009, vol. 60, no. 5, s. 1472–1483.
167. Yawalkar, N., Tschanner, G.G., Hunger, R.E., Hassan, A.S. Increased expression of IL-12p70 and IL-23 by multiple dendritic cell and macrophage subsets in plaque psoriasis. *J Dermatol Sci*, 2009, vol. 54, no. 2, s. 99–105.
168. Zaba, L.C., Cardinale, I., Gilleaudeau, P., Sullivan-Whalen, M., Suárez-Fariñas, M., Fuentes-Duculan, J., Novitskaya, I., Khatcherian, A., Bluth, M.J., Lowes, M.A., Krueger, J.G. Amelioration of epidermal hyperplasia by TNF inhibition is associated with reduced Th17 responses. *J Exp Med*, 2007, vol. 204, no. 13, s. 3183–3194.
169. Zhang, L., Yang, X.Q., Cheng, J., Hui, R.S., Gao, T.W. Increased Th17 cells are accompanied by FoxP3(+) Treg cell accumulation and correlated with psoriasis disease severity. *Clin Immunol*, 2010, vol. 135, no. 1, s. 108–117.

170. Zheng, S.G., Wang, J., Wang, P., Gray, J.D., Horwitz, D.A. IL-2 Is Essential for TGF- $\beta$  to Convert Naive CD4+CD25+ Cells to CD25+Foxp3+ Regulatory T Cells and for Expansion of These Cells. *J Immunol*, 2007, vol. 178, no. 4, s. 2018–2027.

171. Zuwała-Jagiello, J. Haemoglobin scavenger receptor: function in relation to disease. *Acta Biochim Pol*, 2006, vol. 53, s. 257–268.

## 9. Přílohy

### Přehled publikací

#### Původní články

**Kondělková, K.**, Vokurková, D., Krejsek, J., Borská, L., Fiala, Z., Hamáková, K., Andrýs, C. The number of immunoregulatory T cells is increased in patients with psoriasis after Goeckerman therapy. Acta Medica (Hradec Kralove), 2012 (přijato do tisku).

**Kondelkova, K.**, Krejsek, J., Borska, L., Fiala, Z., Hamakova, K., Andrys, C. Expression of soluble sCD163 in serum of psoriatic patients is modulated by Goeckerman therapy. Allergol Immunopathol (Madr.), 2012 (přijato do tisku) **IF = 0,63**.

Habal, P., Mandák, J., Šimek, J., Štětina, M., Jankovičová, K., **Kondělková, K.**, Krejsek, J. Monitorace efektivity chirurgické léčby maligních pleurálních výpotků. Klin Onkol, 2010, vol. 23, no. 2, s. 99-103.

#### Přehledové články

**Kondělková, K.**, Vokurková, D., Krejsek, J., Borská, L., Fiala, Z., Andrýs, C. Regulatory T cells (TREG) and their roles in immune system with respect to immunopathological disorders. Acta Medica (Hradec Kralove), 2010, vol. 53, no. 2, s. 73-77.

Krejsek, J., Hrnčířová, L., **Kondelkova, K.**, Andrýs, C. The Role of Autoimmunity in Gastroenterology. Dig Dis, 2012 (přijato do tisku) **IF = 1,0**.



## **Přednášky a postery na odborných setkáních**

**Kondělková, K.** The number of immunoregulatory T cells (Treg) is increased in patients with psoriasis after Goeckerman therapy (přednáška). 7<sup>th</sup> Postgraduate Medical Students Conference, LF HK, 17.10.2011.

**Kondelkova, K.**, Vokurkova, D., Borská, L., Fiala, Z., Hamáková, K., Rehacek, V. Elevated regulatory T cells (Tregs) in the blood of psoriatic patients treated with Goeckerman therapy (poster). Mezinárodní konference Analytical Cytometry V, Olomouc, 5. - 8.9.2009

**Kondělková, K.**, Andrýs, C., Hamáková, K., Řeháček, V., Borská, L. Expresse vychytávacího receptoru pro hemoglobin CD163 na monocytech pacientů s psoriázou a změny po Goeckermanově terapii (poster). XXVII. Sjezd Českých a Slovenských Alergologů a Klinických imunologů s mezinárodní účastí, Olomouc, 6. - 9.10.2010.

**Kondělková, K.**, Hamáková, K., Řeháček, V., Borská, L., Andrýs., C. Expression of haemoglobin scavenger receptor CD163 on monocytes of psoriatic patients and its changes after Goeckerman's therapy (poster). Mezinárodní konference Annual Meeting of the Austrian Society for Allergology and Immunology (ÖGAI) with the co-operation with the national societies of Croatia, Czech Republic, Hungary, Slovakia and Slovenia, Vídeň, 3. - 5.12.2010.